



# Expression, purification et réévaluation du rôle de la protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique

Abdallah Khatib

## ► To cite this version:

Abdallah Khatib. Expression, purification et réévaluation du rôle de la protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1038 . tel-01381736

**HAL Id: tel-01381736**

**<https://theses.hal.science/tel-01381736>**

Submitted on 14 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

Discipline : **Biochimie**  
Présentée et soutenue par :

**Abdallah KHATIB**

---

Expression, purification et réévaluation du rôle de la  
protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique.

---

Directeur de thèse :  
**Pr. Abdelkarim ABOUSALHAM**

Co-encadrant :  
**Dr. Alexandre NOIRIEL**

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires  
Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques  
(UNIVERSITÉ LYON 1)

Soutenue le 30 Mars 2016 devant le jury :

**Rapporteurs**

Dr. Frédéric CARRIÈRE

Dr. Eric MARÉCHAL

Dr. Vincent ARONDEL

**Examineurs**

Pr. Michel GUICHARDANT

Pr. Abdelkarim ABOUSALHAM

Dr. Alexandre NOIRIEL



# REMERCIEMENTS

---

Mes premiers mots de reconnaissance et ma profonde gratitude vont vers mon encadrant le Pr. Abdelkarim Abousalham et mon co-encadrant le Dr. Alexandre Noiriél. Je les remercie de m'avoir accueilli dans le laboratoire, de me donner la chance de faire partie du monde de la recherche et de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Leur disponibilité, leurs remarques pertinentes et leur soutien tout au long de cette thèse m'ont permis d'acquérir la rigueur scientifique indispensable à la réalisation de ce travail, ainsi leur gentillesse et leur patience ont instauré les meilleures conditions dont on puisse rêver pour travailler. Merci de m'avoir toujours encouragé et d'avoir toujours été optimiste, surtout pendant mes longues périodes de maladie. Je vous prie donc d'accepter mes très sincères remerciements pour toute l'aide que vous m'avez apportée.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury. Je remercie le Pr. Michel Guichardant pour avoir été examinateur de ma thèse et aussi de présider le jury. De même, je remercie le Dr. Frédéric Carrière, le Dr. Eric Maréchal et le Dr. Vincent Arondel pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de rapporter cette thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire et au personnel de l'ODMB et en particulier mes collègues, Renaud, Meddy, Yani et Priscilla pour leur ambiance agréable, les discussions scientifiques ou non, ainsi que pour leur gentillesse et leur amitié.

Je tiens à remercier tous les membres de ma famille au Liban ou ici en France et en particulier mon oncle et mes cousins pour leur soutien, leur confiance et leur encouragement. Je souhaite aussi remercier tous mes amis qui m'ont permis d'échapper au stress induit par la thèse. Je cite Bilal, Firas, Issam, Shedy, Okba, Wissam, Nour, ...

Mes plus profonds remerciements vont à mon père, Nasser, ma mère, Najat, ainsi qu'à Rihab, Mariam et Omar. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir, qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.



# TABLE DES MATIERES

---

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>10</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>13</b>
<b>I. Les Lipides : .....</b>	<b>13</b>
1. Classification : .....	13
1.1. Classification des lipides selon leur polarité : .....	13
1.1.1. Lipides non polaires : .....	13
1.1.2. Lipides polaires : .....	13
1.2. Classification des lipides selon leur structure : .....	14
1.3. Classification des lipides selon leurs fonctions chimiques: .....	15
2. Auto-organisation des lipides en phase aqueuse : .....	16
2.1. Films monomoléculaires : .....	16
2.2. Émulsions : .....	16
2.3. Liposomes : .....	16
2.4. Micelles : .....	18
2.5. Cristaux liquides : .....	18
3. Rôles et stockage des lipides : .....	18
3.1. Réserve énergétique : .....	19
3.1.1. Le tissu adipeux : .....	19
3.1.1.1. Le tissu adipeux blanc : .....	19
3.1.1.2. Le tissu adipeux brun : .....	20
3.1.2. Les oléosomes : .....	20
3.1.2.1. Synthèse et formation des oléosomes : .....	22
3.1.2.2. Synthèse des TG : .....	23
3.2. Isolant thermique : .....	24
3.3. Membrane biologique : .....	24
3.4. Médiateurs lipidiques : .....	25

3.5. Lipides ayant d'autres fonctions biologiques :	26
<b>II. Les Lipases :</b>	<b>27</b>
1. Introduction :	27
2. Spécificité des lipases :	27
3. Modèle cinétique interfacial :	28
4. Aspects structuraux des lipases :	30
4.1. Le repliement $\alpha/\beta$ hydrolase :	30
4.2. La triade catalytique :	32
4.3. Le trou oxyanionique :	32
4.4. Le volet amphiphile :	33
4.5. Le site de liaison au substrat :	34
5. Mécanisme d'action des lipases :	35
<b>III. La Lipolyse Adipocytaire :</b>	<b>37</b>
1. Les enzymes lipolytiques du tissu adipeux :	37
1.1. La lipase hormono sensible HSL :	38
1.2. La lipase des monoglycérides MGL :	39
1.3. L'ATGL, nouvelle TG lipase du tissu adipeux :	39
1.3.1. Historique :	39
1.3.2. ATGL, iPLA2 $\zeta$ ou desnutrin, nouvelle TG lipase :	39
1.3.3. Localisation de l'ATGL :	40
1.3.4. Données structurales sur l'ATGL :	40
1.3.5. L'importance et la fonction de l'ATGL :	43
1.3.6. Surexpression et propriétés enzymatiques de l'ATGL :	47
2. Protéines liées à la gouttelette lipidique du tissu adipeux :	49
2.1. Les Périlipines :	49
2.2. G0/G1 <i>Switch protein 2</i> (G0S2) :	50
2.3. La protéine CGI-58 :	50
2.3.1. Historique :	50
2.3.2. Localisation :	51
2.3.3. Données structurales :	51
2.3.4. Importance de la protéine CGI-58 :	55
2.3.4.1. La protéine CGI-58 et la peau :	56

2.3.4.2. La protéine CGI-58 dans le tissu adipeux :	58
2.3.4.3. La protéine CGI-58 dans le foie :	58
2.3.4.4. La protéine CGI-58 et la sensibilité à l'insuline :	58
2.3.5. Rôle et activité enzymatique de la protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique :	59
3. Régulation de la lipolyse :	63
3.1. Contrôle hormonal de la lipolyse :	63
3.1.1. Les catécholamines :	63
3.1.2. L'insuline :	64
3.2. Régulation de l'ATGL :	65
3.2.1. Par la protéine CGI-58 :	65
3.2.2. Par la protéine G0S2 :	67
3.2.3. Par les hormones :	67
3.2.4. Par les périlipines :	67
3.2.5. Par phosphorylation :	68
3.2.6. Par régulation de la transcription :	69
3.2.7. Par les acyl-CoA à longue chaîne :	70
4. Modèle hypothétique de la lipolyse :	70
<b>IV. La Lipolyse chez les plantes :</b>	<b>72</b>
1. Clonage et purification des lipases candidates :	73
2. Identification de la lipase « Sugar dependent 1 » dans les graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> :	73
2.1. Localisation subcellulaire :	75
2.2. Spécificité de substrat :	76
2.3. Régulation :	76
3. L'homologue de la protéine CGI-58 chez <i>A. thaliana</i> :	78
3.1. Activité enzymatique de la protéine CGI-58 d' <i>A. thaliana</i> :	82
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>84</b>
<b>I. Matériel :</b>	<b>84</b>
1. Vecteurs de clonage :	84
2. Souches utilisées pour le clonage et l'expression :	87
2.1. <i>Escherichia coli</i> :	87

2.2. <i>Pichia pastoris</i> :	88
3. Origine des ADNc codant les différentes protéines :	89
4- Milieux de culture :	89
5- Enzymes de modification :	90
6. Amorces et leurs cibles :	91
7. Lipides et réactifs radiomarqués :	91
<b>II. Méthodes :</b>	<b>92</b>
1. PCR « polymerase chain reaction » :	92
2. Electrophorèse sur gel d'agarose :	92
3. Purification d'ADN :	93
4. Quantification et vérification de l'ADN :	93
5. Clonage :	94
5.1. Amplification et modification des ADNc :	94
5.2. Digestion des produits de PCR et des vecteurs :	94
5.3. Déphosphorylation des plasmides :	94
5.4. Ligation :	94
5.5. Transformation de la souche Top10 d' <i>E. coli</i> :	94
5.6. Analyse par PCR des clones recombinants et purification de l'ADN plasmidique :	95
6. Expression de protéines recombinantes :	95
6.1. Expression dans <i>E. coli</i> :	95
6.2. Expression dans <i>Pichia pastoris</i> :	96
7. Extraction et purification de protéines recombinantes :	96
7.1. Extrait cellulaire brut :	96
7.2. Purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité:	96
7.2.1. En conditions natives :	97
7.2.2. En conditions dénaturantes :	97
7.3. Chromatographie d'exclusion :	97
7.4. Purification de protéines recombinantes par chromatographie échangeuse d'anions :	98
8. Analyse de l'expression et de la purification de protéines recombinantes :	98
8.1. Dosage des protéines :	98
8.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes :	98

8.3. Transfert des protéines sur membrane et révélation par immunoempreinte :.....	99
8.4. Spectrométrie de masse : .....	99
9. Activités enzymatiques : .....	99
10. Mutagénèse dirigée : .....	101
11. Extraction et analyse des lipides par chromatographie sur couche mince : .....	101
12. Quantification des lipides : .....	101
13. Analyses statistiques : .....	102
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>103</b>
<b>I. Comparative Gene Identification-58 ou CGI-58 .....</b>	<b>103</b>
1. Tentatives de purification de la protéine <i>MmCGI-58</i> : .....	104
1.1. Expression dans <i>E. coli</i> (souche BL21(DE3)) de la protéine <i>MmCGI-58</i> : .....	104
1.1.1. Construction des plasmides : .....	104
1.1.2. Transformation dans <i>E. coli</i> et expression : .....	104
1.1.3. Purification de la protéine <i>MmCGI-58</i> étiquetée par 6xHis en N-terminal : ....	105
1.1.3.1. Purification en conditions natives : .....	105
1.1.3.2. Purification en conditions dénaturantes : .....	106
1.1.3.3. Optimisation de la purification en conditions natives : .....	107
1.1.4. Purification de la protéine <i>MmCGI-58</i> étiquetée par 12xHis en N-terminal : ..	108
1.1.4.1. Purification en conditions natives sur colonne de cobalt : .....	108
1.1.4.2. Purification en conditions natives sur colonne de nickel : .....	109
1.1.4.3. Optimisation de la purification en conditions natives sur colonne de nickel : .....	110
2. Tentative de purification de la protéine <i>AtCGI58</i> : .....	111
2.1. Tentative d'expression dans <i>P. pastoris</i> de la protéine <i>AtCGI58</i> : .....	112
2.1.1. Préparation des plasmides : .....	112
2.2. Tentative d'expression dans <i>E. coli</i> (souche BL21(DE3)) de la protéine <i>AtCGI-58</i> : .....	114
2.2.1. Préparation des constructions : .....	114
2.2.2. Transformation dans <i>E. coli</i> et expression : .....	115
2.2.3. Purification de la protéine <i>AtCGI-58</i> Trc étiquetée par 6xHis en N-terminal : ..	117
2.2.4. Optimisation de la purification en conditions natives sur colonne de nickel : ..	117
2.2.5. Purification en conditions dénaturantes de la protéine <i>AtCGI-58</i> étiqueté en N- terminal et tronquée : .....	118

2.2.6. Purification sur colonne de cobalt de la protéine <i>AtCGI-58</i> étiquetée en N-terminal et tronquée :	119
2.2.7. Analyse par immunoempreinte de la protéine <i>AtCGI-58</i> étiquetée en N-terminal et tronquée :	121
3. Tests d'activité enzymatique <i>in vitro</i> de la protéine CGI-58 purifiée à partir de la souche BL21(DE3) d' <i>E. coli</i> :	122
3.1. Tests d'activité LPAAT <i>in vitro</i> de la protéine CGI-58 mesurés par CCM :	122
3.2. Tests d'activité lipase et phospholipase <i>in vitro</i> de la protéine <i>AtCGI-58</i> :	123
3.3. Détection de l'activité LPAAT <i>in vitro</i> de la protéine CGI-58 par spectrométrie de masse :	125
4. Tests de mesure de l'activité LPAAT <i>in vivo</i> de la protéine CGI-58 :	126
4.1. Co-expression du gène de la T7 RNA polymérase avec le plasmide pET28b(+) :	127
4.1.1. Test du caractère "leaky" du promoteur T7 :	127
4.1.2. Clonage de la T7 RNA polymérase dans le plasmide pACYC184 :	129
4.1.3. Test d'activité enzymatique de l'enzyme T7 RNA polymérase :	130
4.1.4. Plasmide pAKT7 :	131
4.2. Clonage des gènes <i>plsC</i> des souches BL21 et SM2-1 :	132
4.2.1. Clonage des gènes <i>plsC</i> muté ou sauvage dans le plasmide pET28b(+) :	132
4.2.2. Criblage des transformants :	132
4.2.3. Séquençage et alignement :	133
4.3. Test <i>in vivo</i> de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 dans la souche SM2-1 :	134
4.3.1. Vérification du bon fonctionnement du système de complémentation de la souche SM2-1 :	134
4.3.2. Complémentation de la souche SM2-1 par la protéine CGI-58 :	137
4.3.2.1. Vérification <i>in vivo</i> de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par complémentation à 42°C :	137
4.3.2.2. Vérification <i>in vivo</i> de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par complémentation en présence de cuivre :	138
5. Mutagenèse dirigée des gènes <i>CGI-58</i> de souris et d' <i>Arabidopsis thaliana</i> :	142
5.1. Criblage des polyinsertions :	143
6. Tests d'activité <i>in vitro</i> de la protéine CGI-58, purifiée à partir de la souche SM2-1 d' <i>E. coli</i> :	143
6.1. Tests d'activité LPAAT de la protéine CGI-58, purifiée à partir de la souche SM2-1 :	144

6.2. Tests d'activité TG lipase et phospholipase A <sub>2</sub> de la protéine CGI-58, purifiée à partir de la souche SM2-1 :	145
7. Tests d'activité LPGAT de la protéine CGI-58 :	148
7.1. Tests d'activité LPGAT <i>in vitro</i> :	148
7.1.1. Clonage du gène <i>pgsA</i> dans le plasmide pET28b(+) :	149
7.2. Tests d'activité LPGAT <i>in vivo</i> :	150
7.2.1. Préparation de système de complémentation :	150
7.2.2. Complémentation de la souche MN7 par la protéine CGI-58 :	151
7.2.3. Vérification de l'activité LPGAT <i>in vivo</i> par extraction et analyse des lipides :	152
7.2.4. Vérification de l'activité LPGAT de la protéine <i>MmCGI-58</i> :	153
8. Activité PG hydrolase de la protéine CGI-58 d' <i>Arabidopsis</i> :	155
8.1. Tests d'activité PG hydrolase de la protéine <i>AtCGI-58 in vitro</i> :	155
8.1.1. Synthèse de PG radiomarké :	155
8.1.2. Mesure de l'activité PG hydrolase :	156
8.2. Tests d'activité PG hydrolase de la protéine CGI-58 <i>in vivo</i> :	157
8.2.1. Détection de l'activité PG hydrolase de la protéine CGI-58 par CCM :	157
8.2.2. Mesure quantitative de l'activité PG hydrolase par spectrométrie de masse :	158
<b>II. Adipocyte triglycérade lipase ou ATGL</b> .....	<b>161</b>
1. Tentative d'expression dans <i>P. pastoris</i> de l'ATGL murine ou <i>MmATGL</i> :	161
1.1. Choix du vecteur pGAPZαA :	161
1.2. Gène murin :	162
1.3. Préparation du vecteur et insert :	162
1.4. Criblage et purification du plasmide recombinant :	163
1.5. Vérification de la séquence du plasmide recombinant :	164
1.6. Transformation de <i>P. pastoris</i> et criblage :	165
1.7. Expression de l'ATGL recombinante :	166
2. Tentative d'expression dans <i>P. pastoris</i> de l'homologue de l'ATGL chez <i>A. thaliana</i> :	167
2.1. Préparation du plasmide :	168
3. Tentative d'expression dans <i>E. coli</i> de <i>MmATGL</i> :	169
3.1. Préparation des plasmides :	169
3.2. Expression et purification de la protéine <i>MmATGL</i> dans <i>E. coli</i> :	171

3.2.1. <i>Mm</i> ATGL étiquetée 6xHis en N-terminal :.....	171
3.2.1.1. Expression de la protéine <i>Mm</i> ATGL 6xHis N-terminal :.....	171
3.2.1.2. Purification de la protéine <i>Mm</i> ATGL 6xHis N-terminal : .....	172
3.2.2. <i>Mm</i> ATGL étiquetée 6xHis en C-terminal :.....	174
3.2.2.1. Expression de la protéine <i>Mm</i> ATGL 6xHis C-terminal :.....	174
3.2.3. Protéine <i>Mm</i> ATGL étiquetée 6xHis en N-terminal et en C-terminal : .....	175
3.2.3.1. Préparation de la construction pET28b- <i>Mm</i> ATGL 6xHis N-terminal et C-terminal :.....	175
3.2.3.2. Expression et purification de la protéine <i>Mm</i> ATGL étiquetée 6xHis en N-terminal et en C-terminal :.....	176
3.2.3.3. Analyse par immunoempreinte de la protéine <i>Mm</i> ATGL 6xHis N-terminal et C-terminal purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-TED :.....	177
3.2.3.4. Purification de la protéine <i>Mm</i> ATGL 6xHis N-terminal et C-terminal par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt : .....	180
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>184</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>187</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>212</b>



# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

13-HPOT	Acide 13(S)-hydroxyperoxylinolénique
3D	Tridimensionnel
AGNE	Acides gras non estérifié
AOS	Allène oxyde synthase
ATGL	Adipocyte triglycéride lipase
CDS	Syndrome de Chanarin-Dorfmann
CGI-58	" <i>Comparative gene identification-58</i> "
CMC	Concentration micellaire critique
CoA	Coenzyme A
C-terminal	Etiquette 6xHis en C-terminal de la protéine
DG	Diglycéride
DGAT	Diacylglycérol acyl-CoA acyltransférase
DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
FL	Version entière de la protéine ou " <i>Full length</i> "
HSL	Lipase hormono sensible
JA	Acide jasmonique
LC/MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LD	Gouttelette lipidique ou " <i>lipid droplet</i> "
LOX	Lipoxygénase
LPL	Lipoprotéine lipase
LUV	Liposome unilamellaire de grande taille ou " <i>Large Unilamellar Vesicle</i> "
MG	Monoglycéride
MGL	Monoglycéride lipase

MLV	Liposome multi-lamellaire ou " <i>Multilamellar Large Vesicle</i> "
NLSD	Maladie de stockage des lipides neutres ou " <i>Neutral Lipid Storage Disease</i> "
NLSDI	Maladie de stockage des lipides neutres avec ichtyose
NLSDM	Maladie de stockage des lipides neutres avec myopathie
N-terminal	Etiquette 6xHis en N-terminal de la protéine
OPDA	Acide 12-oxo-phytodiénoïque
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PDAT	Phospholipide diacylglycérol acyltransférase
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PGC-1	" <i>PPAR Gamma Coactivator 1</i> "
PI	Phosphatidylinositol
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
POPG	1-palmitoyl 2-oléoylphosphatidylglycérol
PPAR $\alpha$	" <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha</i> "
PS	Phosphatidylsérine
<i>sn</i>	" <i>Stereospecific numbering</i> "
SUV	Liposome unilamellaire de petite taille ou " <i>Small Unilamellar Vesicle</i> "
TG	Triglycéride
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
Trc	Version de protéine tronquée de sa séquence putative d'adressage
UCP1	" <i>Uncoupling protein 1</i> "
VLDL	" <i>Very low density lipoprotein</i> "

# LISTE DES FIGURES

---

- Figure 1 :** Représentation schématique des différentes structures adoptées par les lipides en phase aqueuse.
- Figure 2 :** Représentation schématique des oléosines, caléosines et scléroléosines à la surface des oléosomes.
- Figure 3 :** Représentation schématique du modèle de formation des oléosomes dans les tissus de la graine.
- Figure 4 :** Structure **(A)** et voie initiale de la synthèse **(B)** de l'acide jasmonique.
- Figure 5 :** Modèle cinétique interfacial.
- Figure 6 :** Structure secondaire du repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase.
- Figure 7 :** Les variabilités de structure à l'intérieur du repliement hydrolase.
- Figure 8 :** Illustration des deux types de trou oxyanionique.
- Figure 9 :** Structure 3D de la lipase pancréatique humaine complexée avec son cofacteur.
- Figure 10 :** Trois topologies des sites de liaison des lipases.
- Figure 11 :** Mécanisme catalytique des lipases.
- Figure 12 :** Représentation schématique de l'hydrolyse des triglycérides, par les enzymes des adipocytes du tissu adipeux blanc.
- Figure 13 :** Régions conservées et organisation des domaines de l'ATGL.
- Figure 14 :** Structure 3D de la Pat17 illustrant des similitudes de séquence avec l'ATGL humaine **(A)** et modèle de la région Met1-Leu254 de l'ATGL murine, basé sur l'homologie de séquence avec les protéines Pat17 et cPLA<sub>2</sub> **(B)**.
- Figure 15 :** **A :** Représentation des différents domaines de l'ATGL avec la position des différentes mutations. **B :** Tableau récapitulatif des mutations trouvées dans la NLSMD avec les symptômes associés.
- Figure 16 :** Domaines fonctionnels de la lipase ATGL (PNPLA2) chez le sujet normal et chez les patients atteints de NLSD avec myopathie (NLSMD).
- Figure 17 :** Modèle 3D de la protéine CGI-58 murine.
- Figure 18 :** Résolution de la structure du peptide V10-K43 de la protéine CGI-58.
- Figure 19 :** Alignement de séquence des acides aminés de la protéine CGI-58 issue de trois espèces différentes.
- Figure 20 :** **A :** Représentation schématique de la structure du gène *ABHD5* codant la protéine CGI-58 avec les sites des mutations dans le cas de NLSDI ; **B :** Liste des différentes mutations de la protéine CGI-58 trouvées dans les cas de NLSDI ; **C :** représentation des domaines de la protéine CGI-58 avec la position des différentes mutations.
- Figure 21 :** Réaction catalysée par l'acide lysophosphatidique acyl-CoA acyltransférase ou LPAAT.
- Figure 22 :** Modèle 3D théorique de la protéine CGI-58 murine.

- Figure 23 :** Régulation de la lipolyse dans le tissu adipeux blanc par les catécholamines et l'insuline.
- Figure 24 :** Modèle hypothétique de la lipolyse basale et stimulée dans les adipocytes.
- Figure 25 :** Schéma représentatif de l'hydrolyse des TG au cours de la germination des graines.
- Figure 26 :** (A) : Arbre phylogénétique des lipases de la famille *patatin-like*. (B) : Représentation schématisée de la SDP1 d'*Arabidopsis*, de la TGL3 de levure, de l'ATGL humaine et de la protéine patatin de pomme de terre.
- Figure 27 :** Alignement de séquences peptidiques de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* (avec les deux variants At4g24160.1 et At4g24160.2), et son homologue chez le riz, le raisin, la souris, l'Homme, le poisson zèbre, *C. elegans*, la mousse (*Physcomitrella*) et la levure.
- Figure 28 :** Modèle de signalisation par la protéine PXA1 dans les cellules de plantes.
- Figure 29 :** Schéma représentatif de la structure de la protéine PXA1.
- Figure 30 :** Modèle du métabolisme des polyamines chez les plantes.
- Figure 31 :** Carte du vecteur pET28a(+).
- Figure 32 :** Carte du vecteur pGAPZαA.
- Figure 33 :** Carte du vecteur pAR1219 (A) et du vecteur pBR322 (B).
- Figure 34 :** Carte du vecteur pACYC184.
- Figure 35 :** Carte du vecteur pYAT7.
- Figure 36 :** Carte du vecteur pAKT7.
- Figure 37 :** Analyse par SDS-PAGE des extraits protéiques totaux issus de cellules transformées par les trois constructions pET28b-*MmCGI-58*.
- Figure 38 :** Analyse par SDS-PAGE des fractions issues de la purification en conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée en N-terminal.
- Figure 39 :** Analyse par SDS-PAGE de la purification dans des conditions dénaturantes de la protéine *MmCGI-58* étiquetée en N-terminal.
- Figure 40 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée en N-terminal.
- Figure 41 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée en N-terminal en utilisant successivement deux colonnes de nickel (TED et NTA).
- Figure 42 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *MmCGI-58* étiquetée 12xHis en N-terminal en utilisant une colonne de cobalt.
- Figure 43 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée 12xHis en N-terminal dans des conditions natives en utilisant la colonne de nickel.
- Figure 44 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée 12xHis en N-terminal en utilisant successivement deux colonnes (nickel puis cobalt).
- Figure 45 :** Positions des amorces AN023, 026 et 027 utilisées pour avoir les deux versions, FL ou Trc, de la protéine *AtCGI-58*, avec addition des sites XhoI en

5', de NotI en 3', et permettant d'obtenir une étiquette 6xHis en C-terminal par fusion avec la séquence nucléotidique du plasmide pGAPZαA.

- Figure 46 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR sur l'ADNc codant la protéine *AtCGI-58* (A) et du produit de la digestion de l'ADNc de l'*AtCGI-58* et du vecteur pGAPZαA (B).
- Figure 47 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR sur les transformants (souche Top10) contenant la construction pGAPZαA-*AtCGI-58*.
- Figure 48 :** Position des amorces AN022, 023, 024, 025, 120 et 121 utilisées pour obtenir les différentes versions FL et Trc de la protéine *AtCGI-58*, avec l'addition des sites *NotI*, *NcoI* et *NdeI*. Position de l'étiquette 6xHis en N-terminal ou C-terminal par fusion avec la séquence de l'ADN du plasmide pET28b(+).
- Figure 49 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de la PCR sur l'ADNc codant la protéine *AtCGI-58* (A), et du produit de PCR résultant du criblage des bactéries contenant potentiellement la construction pET28b-*AtCGI-58* 6xHis en N-terminal (B).
- Figure 50 :** Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante obtenue à partir de la construction pET28b-*AtCGI-58* N-terminal Trc, pour différentes températures d'induction (37°, 30° et 4°C).
- Figure 51 :** Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante *AtCGI-58* issue de la construction pET28b-*AtCGI-58* N-terminal FL à différentes températures d'induction (37° et 30°C).
- Figure 52 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives à partir de 250 mL de culture.
- Figure 53 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives, à partir d'un litre de culture cellulaire (A) et en lavant la résine avec 20 mM d'imidazole avant l'étape d'élution (B).
- Figure 54 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc par chromatographie d'affinité dans des conditions dénaturantes, à partir d'une culture cellulaire d'un litre, et renaturation sur colonne de nickel.
- Figure 55 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives (A) et en utilisant un gradient d'imidazole (B) purification par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt à partir d'un litre de culture cellulaire.
- Figure 56 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt, à partir d'un litre de culture, et en lavant la colonne avec 15 mM (A) ou 25 mM (B) d'imidazole.
- Figure 57 :** Analyse par immunoempreinte de l'identité de la protéine purifiée *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives, analyse effectuée en utilisant des anticorps anti poly-histidines.
- Figure 58 :** Analyse de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par CCM.
- Figure 59 :** Analyse de l'activité TG lipase (A) et phospholipase (B) de la protéine *AtCGI-58* par CCM.

- Figure 60 :** Cinétique d'hydrolyse du 4-NPP par la protéine *AtCGI-58*.
- Figure 61 :** Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 recombinante.
- Figure 62 :** Croissance comparée, à 30° et 42°C sur boîte LB agar, de la souche sauvage (SM105) et de la souche mutée (SM2-1) pour le gène *plsC*.
- Figure 63 :** Criblage du caractère "leaky" du promoteur T7 par détection de l'expression de la protéine CotA sur milieu LB.
- Figure 64 :** Digestion du plasmide pAR1219 par les enzymes BamHI et PciI.
- Figure 65 :** Repiquage sur matrice des transformants 1 à 24 issus du clonage du fragment T7 RNA polymérase et promoteur lacUV5 dans le plasmide pACYC184 digéré par l'enzyme BamHI.
- Figure 66 :** Criblage de l'activité enzymatique de la T7 RNA polymérase par oxydation de l'ABTS avec la laccase CotA dans les cellules Top10.
- Figure 67 :** Représentation schématique des deux plasmides pYAT7 (A) et pACYC177 (B) avec l'emplacement des sites de restriction utilisés pour la formation du plasmide pAKT7.
- Figure 68 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR sur des transformants issus de la ligation entre le vecteur pET28b(+) et le gène *plsC* sauvage ou muté.
- Figure 69 :** Alignement des séquences peptidiques (logiciel BioEdit) obtenues à partir du gène *plsC* sauvage de la souche BL21 (*wt*) et *plsC* muté de la souche SM2-1 contre la séquence théorique obtenue à partir de la souche DH10B.
- Figure 70 :** Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante, issue de la construction pET28b-*CotA*, dans les souches MG1655 [déficiante en T7 RNA polymérase] et BL21(DE3).
- Figure 71 :** Test d'expression et d'activité enzymatique de la protéine CotA dans les souches MG1655 et BL21(DE3) par coloration du milieu LB agar suite à l'oxydation de l'ABTS par la protéine CotA.
- Figure 72 :** Test de croissance à 30° et 42°C, sur boîte LB agar en présence de 100 µM d'IPTG, de la souche SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et différentes versions du plasmide pET28b(+) (vide ou contenant *plsC wt* ou *plsC* muté).
- Figure 73 :** Test de complémentation à 30° et 42°C, sur boîte LB agar en présence de 100 µM d'IPTG, de la souche SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et les différentes constructions dans le plasmide pET28b(+).
- Figure 74 :** Vérification sur milieu solide de l'effet du cuivre sur la croissance de la souche SM2-1 exprimant ou non la protéine *plsC*.
- Figure 75 :** Vérification *in vivo* de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par complémentation en présence de cuivre sur milieu solide.
- Figure 76 :** Mesure de l'absorbance de la DO à 600 nm reflétant la croissance en milieu liquide, à 30°C et en présence de cuivre, de la souche SM105 et/ou de la souche SM2-1 exprimant ou non la protéine CGI-58.
- Figure 77 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % de l'amplification spécifique d'un fragment de 300 pb chez les clones 1 à 4 des mutants H329A et D303A.



- Figure 78 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* Trc avec 6xHis en N-terminal, et de la protéine *AtCGI-58* FL avec 6xHis en N-terminal dans des conditions natives à partir de la souche SM2-1.
- Figure 79 :** Mesure de l'activité LPAAT des différentes protéines recombinantes par dosage du PA formé.
- Figure 80 :** Mesure de l'activité TG lipase (**A**) et PLA<sub>2</sub> (**B**) des différentes protéines CGI-58 par comptage des dpm totaux retrouvés dans la fraction acide oléique (**A**) ou acide palmitique (**B**) purifiée par CCM.
- Figure 81 :** Mesure de l'activité LPGAT *in vitro* des différentes protéines CGI-58 par comptage des dpm totaux de la fraction PG purifiée par CCM.
- Figure 82 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR de l'amplification du gène *pgsA*.
- Figure 83 :** Criblage par PCR des transformants positifs contenant le plasmide pET28b-*pgsA*. Une bande nucléotidique de 550 pb indique la présence du plasmide recombinant.
- Figure 84 :** Test de croissance à 30° et 42°C sur boîte LB agar de la souche sauvage MG1655 et de la souche MN7 mutée dans le gène *pgsA*.
- Figure 85 :** Test de croissance à 30° et 42°C sur boîte LB agar en présence d'IPTG (10 µM) de la souche MN7 transformée par le plasmide pYAT7 ou le plasmide pET28b-*pgsA*.
- Figure 86 :** Test de croissance à 30° et 42°C sur boîte LB agar en présence d'IPTG (10 µM) de la souche MN7 transformée par le plasmide pYAT7 et différentes constructions dans le pET28b(+) permettant l'expression de différentes versions de la protéine CGI-58.
- Figure 87 :** Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques de la souche MN7 exprimant la protéine *pgsA*.
- Figure 88 :** Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques de la souche MN7 exprimant la protéine CGI-58.
- Figure 89 :** Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques des différentes souches d'*E. coli* exprimant la protéine *MmCGI-58*.
- Figure 90 :** Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques de la souche BL21 d'*E. coli* exprimant la protéine *MmCGI-58* sauvage ou mutée (N155S).
- Figure 91 :** Analyse par CCM de la réaction de transphosphatidylolation catalysée par la PLD.
- Figure 92 :** Mesure de l'activité PG hydrolase de la protéine *AtCGI-58* par comptage des dpm totaux retrouvés dans la fraction acide palmitique purifiée par CCM.
- Figure 93 :** Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques des différentes souches d'*E. coli* exprimant la protéine CGI-58 sauvage (**A**) ou mutée (**B**).
- Figure 94 :** Mesure par spectrométrie de masse de la quantité de PG et PE dans les extraits lipidiques de la souche SM2-1 exprimant les différentes versions de la protéine CGI-58.
- Figure 95 :** Représentation schématique des deux plasmides pGAPZαA-*MmATGL* mutée (**A**) et pcDNA4-HisMax-*MmATGL* sauvage (**B**).

- Figure 96 :** Vérification par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) de la digestion par EcoRI et SstI du vecteur pGAPZαA-*MmATGL* mutée et du vecteur pcDNA4-HisMax-*MmATGL* sauvage.
- Figure 97 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR obtenu sur les transformants (dans la souche Top10) contenant potentiellement la construction pGAPZαA-*MmATGL*, en utilisant les amorces AN059 et AN060.
- Figure 98 :** Vérification par coupure enzymatique du clonage du plasmide pGAPZαA-*MmATGL*.
- Figure 99 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR sur les transformants de la souche X33 contenant la construction pGAPZαA-*MmATGL*, en utilisant les amorces AN029 et AN047.
- Figure 100 :** Analyse par immunoempreinte de l'expression de l'ATGL dans *P. pastoris* dans différentes fractions de culture.
- Figure 101 :** Alignement de séquences peptidiques de la protéine ATGL de plante (SDP1) et de mammifères (Homme, souris, rat).
- Figure 102 :** Amplification du gène codant l'*AtATGL* par PCR.
- Figure 103 :** (A) : Les trois constructions de *MmATGL* avec la position de l'étiquette et les sites de restriction ajoutés. (B) : Position des amorces AN032, 051, 052 et 053 utilisées pour obtenir les trois constructions *MmATGL*.
- Figure 104 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de la PCR réalisée sur l'ADNc de *MmATGL*.
- Figure 105 :** (A) : Enzymes de restriction utilisées pour la coupure de l'insert *MmATGL* et du vecteur pET28b(+). (B) : Position des sites de restriction utilisés pour la coupure du vecteur pET28b(+) et des trois constructions *MmATGL*.
- Figure 106 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) de la digestion de l'insert *MmATGL* et du vecteur pET28b(+).
- Figure 107 :** SDS-PAGE montrant les expressions de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal exprimée dans la souche BL21pRIPL dans des conditions de température et de temps différentes.
- Figure 108 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification en conditions natives de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal.
- Figure 109 :** Analyse par SDS-PAGE de la purification en conditions dénaturantes sur résine de nickel de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal.
- Figure 110 :** SDS-PAGE montrant les expressions de la protéine *MmATGL* 6xHis C-terminal exprimée dans la souche BL21pRIPL dans des conditions de température et de temps différentes.
- Figure 111 :** Représentation schématique des deux plasmides pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal et pET28b-*MmATGL* 6xHis C-terminal.
- Figure 112 :** Analyse par SDS-PAGE de la purification en conditions natives sur colonne de nickel de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal.
- Figure 113 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification en conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal en utilisant un gradient d'imidazole.



- Figure 114 :** Analyse par immunoempreinte, en utilisant des anticorps anti poly-histidines, de l'identité de la protéine purifiée dans des conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-TED.
- Figure 115 :** Analyse par CCM de l'activité triglycéride lipase de la protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-TED.
- Figure 116 :** Mesure par absorbance à 481 nm de l'activité estérase de la protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-TED.
- Figure 117 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal en utilisant un gradient d'imidazole.
- Figure 118 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal, après lavage avec 20 mM d'imidazole.
- Figure 119 :** Analyse par immunoempreinte de l'identité de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal purifiée dans des conditions natives à partir de la résine de cobalt, analyse faite en utilisant des anticorps anti poly-histidines.
- Figure 120 :** Contrôle de la migration des différents réactifs et produits du test triglycéride lipase.
- Figure 121 :** Mesure de l'activité lipase de la protéine *MmATGL* par comptage des dpm totaux retrouvés dans la fraction acide oléique purifiée par CCM.

# LISTE DES TABLEAUX

---

**Tableau 1 :** Structure des glycérophospholipides.

**Tableau 2 :** Phénotype des patients atteints de NLSD avec myopathie (NLSDM) et de NLSD avec ichtyose (NLSDI).

**Tableau 3 :** Liste des différentes enzymes de restriction utilisées avec la séquence cible et le nom du fournisseur.

**Tableau 4 :** Bilan de la purification de la protéine *MmATGL* en conditions dénaturantes.

# AVANT-PROPOS

---

Chez les êtres vivants, les triglycérides (TG) constituent la principale réserve énergétique de l'organisme. Ces TG sont stockés plus particulièrement, chez les mammifères, sous forme de gouttelettes lipidiques ou, "*lipid droplet*" (LD) cytoplasmiques dans les adipocytes, et chez les plantes dans les oléosomes des graines, mais on peut les trouver aussi dans toutes les cellules de ces organismes. Les LD jouent un rôle crucial dans l'homéostasie énergétique *via* la lipolyse de leurs réserves de TG, générant les acides gras non estérifiés. Chez les mammifères et dans certaines situations physiologiques (restrictions caloriques), ces acides gras sont délivrés dans le plasma afin de fournir aux organes les substrats énergétiques nécessaires, alors que chez les plantes, ces réserves sont utilisées comme sources de matière carbonée et d'énergie nécessaires pour assurer la post-germination et la croissance de la plantule.

L'hydrolyse des TG du tissu adipeux s'effectue sous l'action successive de la TG lipase du tissu adipeux (ATGL), de la lipase hormono-sensible et de la monoglycéride lipase. La protéine CGI-58 a été mise en évidence comme un cofacteur de l'ATGL. Des mutations des gènes codant la protéine CGI-58 ou l'ATGL sont respectivement à l'origine du syndrome de Chanarin-Dorfmann (CDS) et de maladies de stockage de lipides neutres (NLSL). L'analyse des symptômes de ces deux lipidoses, ainsi que l'invalidation du gène codant la protéine CGI-58 et/ou l'ATGL chez la souris, montrent des phénotypes différents ce qui suggère un rôle supplémentaire de la protéine CGI-58, indépendamment de son rôle de cofacteur de l'ATGL.

La protéine CGI-58 appartient à la famille des  $\alpha/\beta$ -hydrolases, elle possède la triade catalytique Ser-Asp/Glu-His caractéristique des carboxylester hydrolases. Le résidu nucléophile (Ser) putatif, est normalement situé dans le motif consensus Gly-X-Ser-X-Gly ; dans le cas de la protéine CGI-58 de mammifère cette sérine est remplacée par une asparagine. En plus de la triade catalytique, la protéine CGI-58 possède également dans sa partie C-terminale, le motif His-X<sub>4</sub>-Asp, caractéristique d'une activité acyltransférase.

Un homologue de la protéine CGI-58 a été identifié chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Il a été montré que la mutation de la protéine chez les plantes provoque, comme chez les mammifères, une accumulation de lipides dans tous les tissus de la plantes, indiquant une implication potentielle de cette protéine dans la régulation et l'homéostasie lipidique chez les plantes. Ce qui est intéressant, pour la protéine CGI-58 de plante, est la présence de la sérine dans le motif Gly-X-Ser-X-Gly, et donc la présence d'une potentielle activité lipase de la protéine, en plus de l'activité potentielle acyltransférase impliquant le motif HX<sub>4</sub>D, conservé chez les protéines de plante.

Par ailleurs, il a été montré la présence d'un homologue de l'ATGL chez les plantes, appelé SDP1 (*Sugar Dependent Protein 1*), mais jusqu'à présent, aucune relation n'a été rapportée entre la protéine CGI-58 et SDP1.

Plusieurs études ont été menées dans le but de caractériser l'ATGL et son cofacteur, la protéine CGI-58. Pour l'ATGL, toutes ces études ont été faites sur des extraits cellulaires exprimant l'enzyme, et non pas sur une fraction purifiée à homogénéité. Pour la protéine CGI-58, les études ont été faites, dans le cas de la protéine de mammifère, en utilisant la protéine recombinante purifiée dans des conditions natives à partir des bactéries, alors que pour son homologue chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine recombinante a été purifiée dans des conditions dénaturantes en présence d'urée.

A ce jour, le rôle de la protéine CGI-58, comme activateur de l'ATGL, a été certes bien étudié et démontré aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* chez les mammifères, mais non chez les plantes. Son implication, dans le métabolisme lipidique, indépendamment de l'ATGL, de même que son activité enzymatique, ne sont pas totalement clarifiées. En fait, plusieurs activités ont été rapportées pour la protéine CGI-58, des activités acide lysophosphatidique acyl-CoA acyltransférases (LPAAT) pour la protéine de mammifère et de plante, une activité lysophosphatidylglycérol acyl-CoA acyltransférase (LPGAT) pour la protéine de mammifère, et une activité TG lipase / phospholipase pour la protéine de plante ; toutes ces activités ont été montrées *in vitro* sur des fractions purifiées contenant la protéine recombinante. Cependant, l'activité acyltransférase rapportée pour la protéine CGI-58 de mammifère a été montrée, récemment, comme étant due à une protéine contaminante obtenue durant la purification de la protéine recombinante.

Les deux buts principaux de cette thèse ont été donc de purifier l'ATGL et les deux protéines CGI-58 murine et d'*Arabidopsis thaliana*, à homogénéité et dans des conditions natives, et d'étudier l'activité de ces trois protéines *in vivo* et *in vitro*. Nous avons donc développé une nouvelle stratégie, en générant des plasmides qui nous ont permis, d'exprimer et de purifier la protéine CGI-58 de souris et de plante ainsi que l'ATGL murine, dans différentes souches d'*E. coli*, pour tester l'activité enzymatiques *in vitro* de ces protéines. De plus, nous avons mis en place, en utilisant les plasmides générés et différentes souches d'*E. coli*, un système qui nous a permis de tester *in vivo*, dans *E. coli*, l'activité acyltransférase (LPAAT et/ou LPGAT) de la protéine CGI-58.

Ce manuscrit se décompose en plusieurs parties. Une première partie est consacrée à une revue bibliographique présentant les caractéristiques des lipides, ainsi que les caractéristiques générales des lipases, puis décrivant la lipolyse chez les mammifères, ainsi que la lipolyse chez les plantes, et l'implication, plus particulièrement, de l'ATGL et de la protéine CGI-58 dans la régulation du métabolisme lipidique. Une seconde partie est consacrée aux Matériel et Méthodes utilisés durant cette thèse. La troisième partie est relative aux résultats obtenus pour la purification de l'ATGL et de la protéine CGI-58, ainsi que les tests enzymatiques et de complémentations réalisés *in vivo* et *in vitro*.

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---

## I. Les Lipides :

Les lipides constituent une classe de molécules biologiques organiques amphiphiles (graisses ou huiles) solubles dans les solvants organiques et qui se distinguent des autres composants de la matière vivante par leur insolubilité dans l'eau. Ils sont constitués d'un squelette aliphatique, cyclique ou polycyclique, constituant la partie hydrophobe, sur lequel peuvent être fixés des groupements polaires, constituant la partie hydrophile.

On inclut dans les lipides : les graisses, les huiles, les cires et certaines substances qui leur sont apparentées (stérols, stéroïdes, terpènes, etc.).

### 1. Classification :

La classification des lipides peut se faire selon leurs propriétés physique à température ambiante (huile liquide, graisse solide), leur polarité (lipides polaires, lipides neutres), leur structure (simple ou complexe) ou encore leurs fonctions chimiques.

#### 1.1. Classification des lipides selon leur polarité :

Sur la base de leur comportement dans la phase aqueuse ainsi qu'à l'interface air-eau ou huile-eau, Small (Small, 1968) a distingué deux grands groupes de lipides, les lipides non polaires et les lipides polaires.

##### 1.1.1. Lipides non polaires :

Cette classe de lipide est totalement insoluble dans l'eau. Les lipides non polaires ne forment pas de couches monomoléculaires. On trouve dans cette catégorie les hydrocarbures ramifiés ou insaturés ainsi que les composés terpéniques (comme par exemple le carotène, le limonène, le géraniol ou encore le squalène).

##### 1.1.2. Lipides polaires :

Les lipides de ce groupe s'étalent partiellement à la surface de l'eau en formant des films monomoléculaires stables. Small (Small, 1968) a subdivisé ce groupe en trois classes :

- Classe I :

Cette classe comprend des lipides ne présentant pas le phénomène de gonflement. Ils forment des films monomoléculaires stables à l'interface eau-air (par exemple les TG, les diglycérides ou DG, les phytols, les rétinols, les vitamines A, K et E, les cires et les stérols). Parce qu'ils ne sont pas chargés électriquement, les glycérides (ou acylglycérols), ainsi que le cholestérol et ses esters, sont appelés lipides neutres.

- Classe II :

Cette classe comprend des molécules amphiphiles insolubles dans l'eau et qui s'étalent également à la surface de l'eau pour former des films monomoléculaires stables (exemples : phospholipides, monoglycérides (MG), acides gras). Ces lipides s'hydratent et gonflent pour former des phases lyotropes (cristallines liquides) bien définies. Ils peuvent donner naissance par exemple à des vésicules appelées liposomes (**cf. partie I.2.3**).

- Classe III :

Cette classe comprend des lipides polaires solubles dans l'eau qui forment des films monomoléculaires instables à l'interface air-eau, en équilibre avec des molécules, à l'état de solution monomérique dans la phase aqueuse. Lorsque la concentration en lipides polaires de classe III excède la concentration micellaire critique (CMC), ces lipides s'organisent de manière à minimiser le contact entre leurs parties apolaires et le milieu aqueux, ils forment alors des micelles (**cf. partie I.2.4**). On trouve dans cette catégorie les détergents cationiques, anioniques, non ioniques, ainsi que les lysophospholipides, les acides gras ionisés et les sels biliaires.

## 1.2. Classification des lipides selon leur structure :

Une classification des lipides selon leur structure sépare les lipides en trois classes : lipides simples, lipides complexes et lipides dérivés (Akoh and Min, 2008).

- **Lipides simples :**

Ils résultent de la condensation d'acides gras avec des alcools par une liaison ester ou amide, cette classe inclut les acylglycérols, les acylglycérols-éther, les cériques (esters d'alcool gras et d'un acide gras) et les stérides (esters de stérol). En général, les lipides simples peuvent être hydrolysés en deux composés différents, souvent un alcool et un acide.

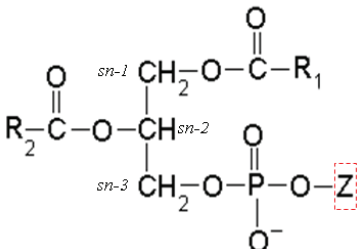
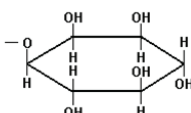
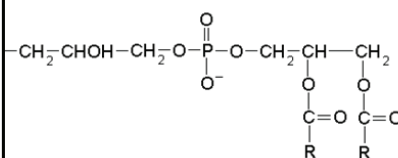
- **Lipides complexes :**

Les lipides complexes contiennent en plus des molécules ci-dessus, du phosphore, de l'azote, du soufre ou des oses. Cette classe comprend les glycérophospholipides (**Tableau 1**), les glycéroglycolipides et les sphingolipides.

Les glycérophospholipides sont des constituants importants des membranes cellulaires. Ils forment des bicouches qui sont les structures de base communes à toutes les biomembranes au travers desquelles s'effectuent les échanges sélectifs des métabolites. Le « squelette » de ces composés est le glycérol (**Tableau 1**) et les positions 1 et 2 du *sn*-glycérol sont le plus souvent estérifiées par des acides gras ( $R_1$  et  $R_2$  dans le tableau 1). La position *sn*-3 est toujours estérifiée par une fonction phosphate qui forme une liaison phosphodiester avec l'hydroxyle d'un alcool. Celui-ci peut être un amino alcool (choline, éthanolamine ou sérine) ou un polyol (glycérol ou inositol) (**Tableau 1**).

Le représentant le plus simple des glycérophospholipides est l'acide phosphatidique, dont la fonction phosphate n'est liée à aucun groupement Z (**Tableau 1**). On ne trouve cette molécule que libre dans les cellules et à l'état de traces, mais c'est un intermédiaire important de la biosynthèse des autres phospholipides.

**Tableau 1:** Structure des glycérophospholipides. *sn* : "stereospecific numbering"

	<b>Z</b>	Glycérophospholipide
	—H	Acide phosphatidique (PA)
	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidylcholine (PC)
	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Phosphatidyléthanolamine (PE)
	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Phosphatidylsérine (PS)
	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$	Phosphatidylglycérol (PG)
		Phosphatidylinositol (PI)
		Glycérol bisphosphatidyle (cardiolipine)

Les glycérophospholipides majeurs des végétaux supérieurs et des animaux sont la phosphatidylcholine (PC), appelée aussi lécithine, ainsi que la phosphatidyléthanolamine (PE). Le phosphatidylglycérol (PG) et la cardiolipine sont trouvés en abondance dans les membranes bactériennes. La cardiolipine se trouve aussi dans les membranes des mitochondries et des chloroplastes.

- **Les lipides dérivés :**

Ces lipides résultent de l'hydrolyse des lipides simples et complexes. Ce sont les acides gras, les alcools gras, les stéroïdes, les isoprénoïdes, appelés encore terpénoïdes, qui sont des dérivés d'unités isoprène. On y trouve également le groupe des composés terpéniques et les dérivés des stérols.

### 1.3. Classification des lipides selon leurs fonctions chimiques :

Cette classification a été proposée par le comité international de classification et nomenclature des lipides à l'initiative du consortium LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) (Fahy *et al.*, 2005; Fahy *et al.*, 2009). Elle consiste à subdiviser les lipides en 8 classes : acides gras, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, stérols, prénols, saccharolipides et polycétides. Tous les lipides et leurs métabolites sont

disponibles dans une banque de données (<http://www.lipidmaps.org>). Un vocabulaire universel est utilisé pour nommer les lipides disponibles dans cette base de données (Fahy *et al.*, 2005; Fahy *et al.*, 2009).

## **2. Auto-organisation des lipides en phase aqueuse :**

Le comportement des lipides en phase aqueuse dépend de leur caractère amphiphile, de leurs charges, de la température, du pH et de la force ionique de la phase aqueuse. En phase aqueuse, les lipides peuvent s'organiser en films monomoléculaires, émulsions, liposomes, micelles ou cristaux liquides.

### **2.1. Films monomoléculaires :**

Les lipides polaires de la classe III (cf. I.1.1.2), dissouts dans un solvant organique volatile, et déposés à l'interface air-eau, s'auto-organisent, après évaporation du solvant organique, en un film monomoléculaire (**Figure 1 A**). Les parties hydrophobes sont orientées côté air et les parties hydrophiles côté eau. Durant la compression isothermique d'un tel film, différentes phases lipidiques peuvent être observées : on distingue par exemple les films gazeux, observés sans compression, dans ce cas l'aire totale des molécules est inférieure à la surface disponible. Suite à la compression du film lipidique, ce dernier passe alors sous forme de liquide expansé, puis de liquide condensé, jusqu'à atteindre la forme de film solide condensé. La pression de surface à partir de laquelle le lipide ne peut plus être comprimé est appelée pression d'affaissement ou "pression de collapse". Au-delà de cette pression, le film n'est plus monomoléculaire, les molécules peuvent se chevaucher car la surface est saturée.

### **2.2. Émulsions :**

L'émulsification en milieu aqueux d'un lipide de la classe I (cf. I.1.1.2) est un processus physicochimique qui provoque une augmentation considérable de la surface de contact lipide-eau. Ainsi, la surface d'une goutte d'huile initiale de 1 cm de diamètre est augmentée d'un facteur  $10^4$  au cours de l'émulsification en particules de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. La vitesse d'hydrolyse des TG par les lipases dépend entre autre de leur degré d'émulsification. *In vivo*, cette émulsion est stabilisée grâce principalement à la présence de phospholipides.

### **2.3. Liposomes :**

Les lipides de la classe II (cf. I.1.1.2) présentant en phase aqueuse un phénomène de gonflement peuvent former des liposomes. Ce sont des structures en bicouches lipidiques closes, sphériques et concentriques. Les têtes polaires de chaque monocouche interagissent avec l'eau tandis que les parties hydrophobes des deux monocouches interagissent ensemble pour exclure l'eau. Les différentes formes de liposomes sont les suivantes (Lichtenberg *et al.*, 1983) (**Figure 1 B**) :

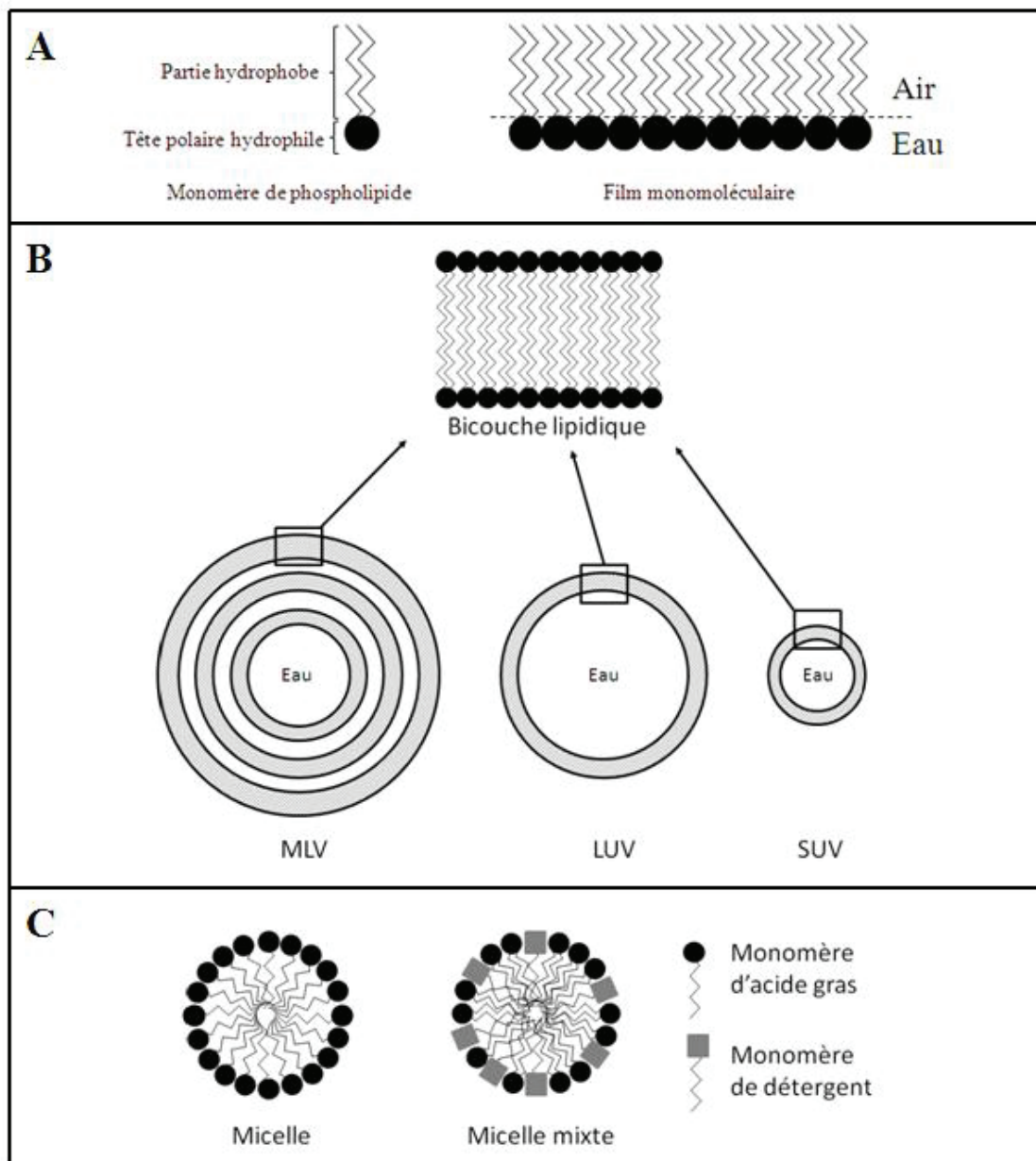
- Les liposomes multi-lamellaires (MLV pour "*Multilamellar Large Vesicles*") : ils s'obtiennent par simple agitation des phospholipides en phase aqueuse. Ces structures, dont le diamètre est supérieur à 200 nm, renferment un volume important d'eau et sont utilisées pour piéger différents composés telles que les substances médicamenteuses qui seront véhiculées à



travers le système circulatoire et dirigées, de manière plus ou moins spécifique, vers leur cible.

- Les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV pour "*Large Unilamellar Vesicles*") : ce sont des liposomes (ou macrovésicules) de diamètre variant de 200 nm à 1000 nm. Les LUV sont préparés à partir d'une fine couche de phospholipides qui est lentement hydratée par une solution aqueuse dépourvue d'électrolytes.

- Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV pour "*Small Unilamellar Vesicles*") : ce sont des bicouches continues (ou microvésicules) de phospholipides d'environ 25 nm de diamètre. Les SUV s'obtiennent par exemple par un traitement aux ultra-sons des MLV.



**Figure 1 :** Représentation schématique des différentes structures adoptées par les lipides en phase aqueuse.

## 2.4. Micelles :

Lorsque la concentration en lipides polaires de la classe III (cf. 1.1.2) excède la CMC, ces lipides s'organisent de manière à minimiser le contact entre leurs parties apolaires et le milieu aqueux : ils forment alors des micelles (**Figure 1 C**). Les parties polaires s'orientent à la périphérie, du côté de la phase aqueuse, et les parties hydrophobes s'agrègent vers l'intérieur. Les solutions micellaires sont isotropes vis-à-vis de la lumière. Lorsque la concentration en lipide augmente, une anisotropie vis-à-vis de la lumière apparaît. Ceci est dû à l'apparition de nouvelles phases appelées cristaux liquides (cf. 1.2.5).

Lorsque les lipides polaires sont mis en suspension, en présence d'une faible quantité d'eau et d'un excès de solvant organique, il se forme des micelles inverses : les parties hydrophobes sont orientées en direction du solvant organique et les parties polaires vers la phase aqueuse, piégeant ainsi dans le cœur de la micelle un micro environnement aqueux. Les micelles sont en équilibre dynamique, c'est à dire qu'il existe des échanges rapides des molécules amphiphiles d'une micelle à l'autre ainsi qu'avec les monomères présents dans le solvant organique environnant.

Chez l'Homme, dans la lumière intestinale, les sels biliaires sont présents à une concentration de 6 à 12 mM, bien supérieure à leur CMC (environ 1 mM). Ils forment alors des micelles mixtes avec certains lipides polaires, comme les phospholipides et les produits d'hydrolyse des TG, MG et acides gras ionisés (**Figure 1 C**). *In vitro*, on forme souvent des micelles mixtes en ajoutant aux phospholipides des détergents tels que le Triton X-100 (Dennis, 1973) ou des sels biliaires.

## 2.5. Cristaux liquides :

Les cristaux liquides existent en équilibre avec les monomères libres en solution et les structures micellaires décrites précédemment. Dans certains cristaux liquides, on observe par exemple des structures hexagonales (la partie polaire des lipides tapisse de longs cylindres disposés suivant une symétrie hexagonale) ou bien cubiques ou bien lamellaires.

Ces structures sont composées de bicouches lipidiques planes (ressemblant aux membranes biologiques), intercalées entre différentes épaisseurs d'eau. Ces structures lamellaires peuvent se restructurer en vésicules ou liposomes (Machy *et al.*, 1987). Lorsque la concentration en lipides augmente encore plus, il peut se former un solide cristallin.

## 3. Rôles et stockage des lipides :

Les lipides, essentiellement les TG, représentent la forme la plus condensée d'énergie disponible pour les tissus biologiques (Gibbons *et al.*, 2000). Ils sont stockés chez les êtres vivants dans différents types cellulaires sous la forme de corps lipidiques. Ces derniers ont une structure sphérique et une composition chimique globale analogue : un cœur de lipides neutres, entouré par une monocouche de phospholipides, de cholestérol et de protéines. Cependant, les proportions des divers constituants de ces corps lipidiques peuvent varier, d'une espèce à une autre, comme dans les graines de plantes oléagineuses et le tissu adipeux

des mammifères, ou d'un tissu à un autre comme le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun chez les mammifères (Murphy and Vance, 1999; Zweytick *et al.*, 2000).

Les réserves lipidiques, mis à part leur utilisation principale comme sources d'énergie, sont aussi utilisées comme isolant thermique, comme précurseurs de médiateurs lipidiques et dans la synthèse des membranes biologiques.

### **3.1. Réserve énergétique :**

La plupart des eucaryotes stockent les lipides neutres dans des inclusions huileuses du cytosol, comme dans les graines des plantes oléagineuses et comme dans le tissu adipeux des mammifères. Cette réserve énergétique offre plusieurs avantages par rapport aux glucides :

- Le catabolisme des lipides par oxydation s'accompagne d'une production d'énergie environ 50 % plus grande.

- Ils sont neutres et très hydrophobes et donc leur stockage se fait sous une forme physique compacte et sans eau.

- Le glycogène est une source rapide de glucose épuisable en une journée, alors que les TG sont une réserve à long terme, voire de quelques mois pour les animaux hibernant.

#### **3.1.1. Le tissu adipeux :**

Le tissu adipeux, constitué de plus de 95 % de TG, est le site le plus important de stockage d'énergie métabolique chez les mammifères. Si chez l'adulte humain, les adipocytes sont tous très semblables, il n'en est pas de même chez le fœtus et le nouveau-né. En effet, au moment de la naissance, une partie des TG est localisée dans des adipocytes particuliers nommés adipocytes bruns, les autres adipocytes étant appelés adipocytes blancs. Ainsi il existe principalement deux types d'adipocytes chez les mammifères : les blancs et les bruns.

##### **3.1.1.1. Le tissu adipeux blanc :**

Les adipocytes blancs (10-100 µm de diamètre) sont généralement majoritaires chez les adultes. Ces cellules sont caractérisées par une grande vacuole lipidique et un noyau plaqué contre la membrane plasmique. Cette vacuole est entourée par une mince couche de cytoplasme contenant les autres organites cellulaires (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique et mitochondries). Grâce à son équipement enzymatique, l'adipocyte peut stocker les acides gras non estérifiés (AGNE) et les transformer en TG (lipogénèse) et mobiliser les TG en les re-transformant en AGNE (lipolyse). Ces AGNE sont relargués dans la circulation et utilisés par les muscles, et notamment par le muscle cardiaque pour fournir de l'énergie (Lafontan and Berlan, 1993). De ce fait, le tissu adipeux représente une des plus importantes réserves énergétiques de l'organisme. C'est à cette réserve que l'organisme fait appel lorsque les réserves de glucides sont épuisées (en cas de jeûne, d'efforts physiques, de lutte contre le froid...) ou inutilisables (en cas de diabète grave).

Les adipocytes blancs sont également des cellules sécrétrices endocrines, capables de communiquer avec le système nerveux central. Par ailleurs, des études réalisées sur des souris

atteintes d'obésité congénitale ont permis de caractériser de nouvelles molécules intervenant dans la régulation des dépenses énergétiques, en particulier au niveau des adipocytes. On y retrouve la leptine (Friedman, 2000), le TNF- $\alpha$  (Hotamisligil *et al.*, 1993), la résistine (Steppan *et al.*, 2001), l'inhibiteur de l'activation du plasminogène de type 1 (PAI-1) ainsi que l'adiponectine (Scherer *et al.*, 1995). Ces différentes molécules ont reçu l'appellation générale d'adipocytokines (Menzaghi *et al.*, 2002).

#### **3.1.1.2. Le tissu adipeux brun :**

A la différence du tissu adipeux blanc, les adipocytes du tissu adipeux brun sont plus nombreux et de taille plus petite (2-10  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Murphy and Vance, 1999). Ils sont richement vascularisés et innervés directement par les fibres orthosympathiques et sont distincts morphologiquement et fonctionnellement des adipocytes blancs. Ils contiennent plusieurs gouttelettes de graisse, et sont principalement caractérisés par la présence d'un très grand nombre de mitochondries, elles-mêmes caractérisées par une membrane interne très développée. La richesse de ce tissu en mitochondries indique que ces cellules ont une forte capacité d'oxydation des substrats que n'ont pas les adipocytes blancs (Nicholls and Locke, 1984). Cette graisse brune est impliquée dans la thermogenèse (Holm *et al.*, 1987; Laurell *et al.*, 2000) : l'énergie, libérée par l'oxydation des AGNE, a la capacité de se convertir en chaleur, au lieu d'être couplée à la phosphorylation oxydative. Le mécanisme de découplage de la respiration est dû à la présence spécifique d'une protéine de la membrane interne mitochondriale appelée UCP1 (*uncoupling protein 1*). L'UCP1, activée par les AGNE libérés lors de la lipolyse, constitue une autre voie de retour des protons non couplés à un système catalysant la synthèse d'ATP (ATPase), et l'énergie de l'oxydation est alors dissipée sous forme de chaleur.

#### **3.1.2. Les oléosomes :**

Chez les plantes, les réserves lipidiques des graines sont stockées sous forme de globules appelés oléosomes ou "oil bodies", comme les LD chez les mammifères. Ces oléosomes sont composés d'un cœur de TG, entouré d'une monocouche de phospholipides dans laquelle s'insèrent de petites protéines spécifiques (Murphy, 2001), majoritairement des oléosines qui sont des protéines de structure ; par la présence de ces oléosines, les oléosomes ne fusionnent pas, même lors de la ré-imbibition de la graine au moment de la germination. Chez les plantes, le lieu de stockage initial des TG est l'embryon et/ou l'endosperme des graines (Murphy, 1993). Serrés les uns contre les autres, les oléosomes occupent la majeure partie du volume cellulaire dans les tissus de réserve.

*In situ*, vus au microscope électronique, les oléosomes sont généralement sphériques (Jacks *et al.*, 1967; Tzen and Huang, 1992; Tzen *et al.*, 1997; Yatsu and Jacks, 1972). La taille des oléosomes de diverses espèces de graines varie entre 0.2 et 3  $\mu\text{m}$  selon l'espèce (Tzen *et al.*, 1993).

Tzen *et al.* (Tzen *et al.*, 1993) ont réalisé des dosages qualitatifs et quantitatifs des constituants lipidiques et protéiques d'oléosomes de plusieurs espèces végétales, globalement, il y a toujours plus de 94 % de lipides neutres (essentiellement des TG), de 0,4 à 2 % de

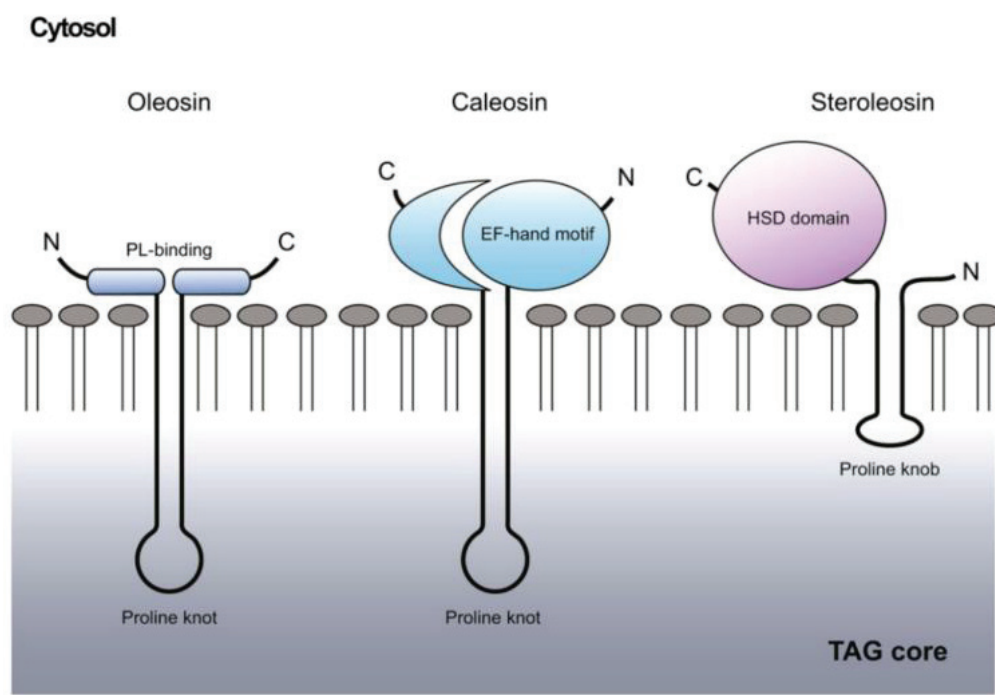
phospholipides (PC 40-65 %, PE 3-16 %, PI 7-21 %, PS 18-25 %) et de 0,5 à 4 % de protéines. Du fait de leur forte teneur en TG, la densité des oléosomes est proche de celle de l'huile, soit 0,92 (Tzen *et al.*, 1993). La surface des oléosomes est hydrophile et hydratée, et ils sont chargés négativement en surface à pH 7,2 (Tzen *et al.*, 1992; Tzen *et al.*, 1993). La stabilité des corps lipidiques des végétaux soumis à dessiccation repose sur deux facteurs : l'encombrement stérique des protéines et la surface chargée négativement de ces corps lipidiques.

Les TG des oléosomes servent de réserve de matière carbonée et d'énergie nécessaires pour assurer la post-germination et la croissance de la plantule. Lors de la germination des graines, les TG sont dégradés pour produire des sources de carbones nécessaires pour alimenter la croissance post-germinative de l'embryon (Graham, 2008; Theodoulou and Eastmond, 2012).

Il est vrai que chez chaque organisme, il existe des tissus spécifiques pour le stockage des lipides, comme le tissu adipeux chez les mammifères ou les oléosomes chez les plantes, mais ces dernières années, il a été montré que tous les types cellulaires ont la capacité de synthétiser et stocker les TG dans des LD (Chapman and Ohlrogge, 2012; Murphy, 2012; Walther and Farese, 2012). De plus, différents rôles et fonctions ont été attribués à ces réserves lipidiques autres que source de carbone et d'énergie, ces réserves sont utilisées également comme sources de signaux lipidiques (Bozza *et al.*, 2011; Chapman *et al.*, 2012; van der Schoot *et al.*, 2011; Zechner *et al.*, 2012), mais aussi dans le trafic des composants intracellulaires (Goodman, 2008; Murphy *et al.*, 2009), et également dans la défense contre les pathogènes (Saka and Valdivia, 2012).

Pour mieux comprendre les différentes fonctions des oléosomes, une vaste gamme des protéines associées à la LD a été identifiée chez différentes organismes (Cermelli *et al.*, 2006; Hodges and Wu, 2010; Jolivet *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012). Chez les plantes plusieurs protéines associées aux oléosomes ont été reconnues pour leurs rôles dans la compartimentation des lipides dans les graines et autres tissus, comme les oléosines, les caléosines et les stéroléosines (Frandsen *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2005; Tzen and Huang, 1992) (**Figure 2**), mais la fonction exacte de la plupart de ces protéines reste à découvrir. Certaines de ces protéines, oléosines et caléosines, sont ancrées fortement dans le corps lipidique et ont en commun une structure dite "triblock", composée de deux domaines hydrophiles situés en N-terminal et C-terminal, et d'un long domaine central hydrophobe, allant jusqu'à 70 acides aminés (**Figure 2**). Chez *Arabidopsis thaliana*, plante modèle en génétique végétale, il existe cinq oléosines et une caléosine de taille allant de 15 à 30 kDa. Le segment central hydrophobe de ces protéines possède quelques similarités avec les répétitions hydrophobes, riches en proline, de l'apo B-100 humaine (protéine séquencée par (Knott *et al.*, 1986), seule composante protéique des LDL).



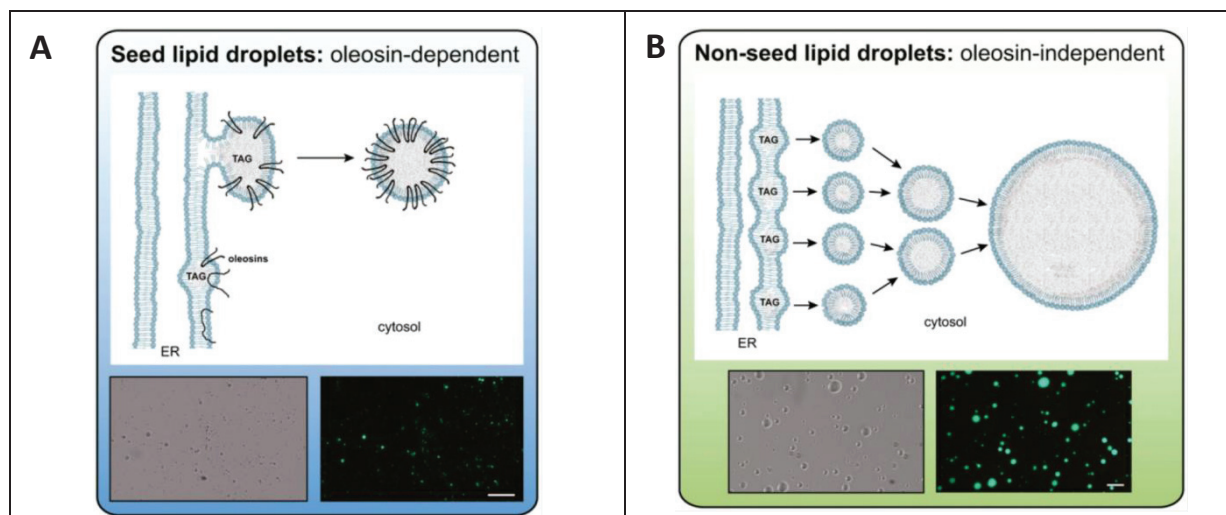


**Figure 2 :** Représentation schématique des oléosines, caléosines et sclérooléosines à la surface des oléosomes. Les domaines N- et C-terminal des oléosines (incluant le domaine d'interaction avec les phospholipides "PL-binding"), caléosines (incluant le domaine de fixation au calcium "EF-hand motif") et sclérooléosines (incluant le domaine homologue à l'hydroxystéroïde déshydrogénase de mammifères "HSD" domain) sont orientés vers le cytosol. Le segment central hydrophobe de ces protéines "Proline knot" est orienté vers la partie centrale de l'oléosome (d'après (Chapman *et al.*, 2012)).

### 3.1.2.1. Synthèse et formation des oléosomes :

Il a été proposé que les oléosomes pourraient se former par l'accumulation de lipides de réserves entre les deux feuillets membranaires du réticulum endoplasmique (RE) (Lynes and Simmen, 2011; Park and Blackstone, 2010; Sparkes *et al.*, 2009). Cette biogenèse des oléosomes serait dépendante des oléosines dans les tissus de la graine (**Figure 3 A**) et indépendante des oléosines dans les autres tissus de la plante (**Figure 3 B**). Le mécanisme exact de leur biogénèse est toujours en question. Il a été proposé que les TG s'accumulent à l'intérieur de la bicouche de la membrane du RE, et que la dilatation de la membrane dans ces endroits provoque le bourgeonnement de la LD entourée par une monocouche de phospholipides. La maturation des oléosomes se termine par le revêtement protéique (Chapman and Ohlrogge, 2012) (**Figure 3**).

Les oléosines sont les constituants majeurs du revêtement protéique chez les plantes, elles recouvrent la quasi-totalité de la surface lipidique et sont responsables de la prévention de la fusion des différents noyaux lipidiques, durant la maturation des graines, la dessiccation et la germination. Les oléosines maintiennent la structure des oléosomes par encombrement stérique et répulsions électrostatiques. Le maintien d'une telle structure et le rapport surface/volume est potentiellement important pour assurer une surface suffisante pour l'action des lipases et/ou l'interaction avec des organelles comme les peroxysomes (Murphy, 1993, 2001; Siloto *et al.*, 2006).



**Figure 3 :** Représentation schématique du modèle de formation des oléosomes dans les tissus de la graine (A : dépendant des oléosines) et dans les autres tissus de la plante (B : indépendant des oléosines). Les micrographies des oléosomes isolés des graines d'*Arabidopsis* sont montrées en mode fond clair (A et B, en bas à gauche) et en épifluorescence (A et B, en bas à droite). (D'après (Chapman *et al.*, 2012)).

Chez les graines de la plante *A. thaliana*, le revêtement protéique identifié comporte cinq oléosines, une caléosine, une stéroléosine, une aquaporine et une protéine avec ancre glycosylphosphatidylinositol (Jolivet *et al.*, 2004).

Récemment, (Cai *et al.*, 2015) ont montrés que la SEIPIN, une protéine de la membrane du réticulum endoplasmique important pour la formation des LD chez l'Homme et les levures, joue encore un rôle dans la formation des LD chez *Arabidopsis thaliana* en modulant la taille et le nombre des oléosomes. La plante *A. thaliana* exprime trois isoformes de la protéine SEIPIN appelé SEIPIN1, SEIPIN2 et SEIPIN3. Les auteurs (Cai *et al.*, 2015) ont montré que la surexpression de SEIPIN1 dans *A. thaliana*, augmente le nombre des LD dans les feuilles, ainsi que dans les graines, et augmente également le contenu lipidique des graines de 10 % par rapport au contrôle.

### 3.1.2.2. Synthèse des TG :

La formation des TG dans les graines est catalysée par les enzymes de la voie métabolique de Kennedy dans le réticulum endoplasmique (RE) (Chapman *et al.*, 2012; Ohlrogge and Browse, 1995). Les acides gras sont transférés à partir de l'acyl-CoA vers le glycérol-3-phosphate en position *sn*-1 et *sn*-2 par deux réactions consécutives acyltransférases, une glycérol-3-phosphate acyltransférase (EC : 2.3.1.15) puis une acide lysophosphatidique acyltransférase (EC : 2.3.1.51) respectivement, pour produire le PA. Le PA est ensuite déphosphorylé en DG par une phosphatidate phosphatase (EC : 3.1.3.4), et un troisième acide gras est transféré à la position *sn*-3 libre du DG à l'aide d'une diacylglycérol acyltransférase (DGAT ; EC : 2.3.1.20) (Ohlrogge and Browse, 1995 ; Bouvier-Nave *et al.*, 2000a ; Bouvier-Nave *et al.*, 2000b ; Banas *et al.*, 2013). Cette étape finale est seulement spécifique à la formation des TG ; en fait, les DG sont souvent convertis en premier lieu en PC puis en PE avant d'être utilisés pour la formation des TG (Bates *et al.*, 2009; Ohlrogge and Browse, 1995). En fait, la seule enzyme qui avait été confirmée comme contribuant à la

formation des TG dans les graines d'*Arabidopsis*, était l'enzyme DGAT1. Mais la génération de mutants *dgat1* (Katavic *et al.*, 1995; Routaboul *et al.*, 1999) a montré que l'enzyme DGAT1 ne produit que 20 à 40 % des réserves lipidiques, ce qui supposait la participation d'autres enzymes dans la synthèse des TG chez les plantes (Lu and Hills, 2002).

Un autre mécanisme, acyl-CoA indépendant, de formation des TG a été récemment décrit, où le groupement acyle de la position *sn*-2 des PC et PE est transféré sur les DG pour former les TG, par l'intermédiaire d'une enzyme appelée phospholipide diacylglycérol acyltransférase ou PDAT (EC : 2.2.1.158) identifiée et caractérisée chez *A. thaliana* (Dahlqvist *et al.*, 2000) (Stahl *et al.*, 2004). Pour bien comprendre la contribution de cette voie de synthèse dans le métabolisme lipidique, Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2009) ont généré des mutants *pdatl* et *dgatl*, et ils ont trouvé que les deux enzymes PDAT1 et DGAT1 contribuent à la synthèse de 70 à 80 % des réserves lipidiques d'*Arabidopsis*. Il a été montré aussi que l'activité de synthèse de TG par PDAT1, en absence de DGAT1, est sous la dépendance de la ré-acylation de la LPC (produite par l'action de la PDAT1) en PC par une acyl-CoA lysophosphatidylcholine acyltransférase 2 (LPCAT2) (EC : 2.3.1.23) (Xu *et al.*, 2012) ; cette activité enzymatique fournit la PC nécessaire pour la formation des TG à partir des DG, réaction catalysée par la PDAT1.

### **3.2. Isolant thermique :**

Le tissu adipeux brun sous-cutané est un isolant thermique très efficace chez les animaux à sang chaud des régions polaires et les animaux hibernant. Chez ces derniers, le tissu adipeux brun est de couleur brune à cause de sa richesse en mitochondries (**cf. I.3.1.1.2**) : il fait fonction de « calorifère » naturel qui permet la diffusion dans tout l'organisme de la chaleur produite. Au lieu d'être couplée à la phosphorylation oxydative et la production de l'ATP, l'énergie libérée par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras a la capacité de se convertir en chaleur. Les AGNE, libérés lors de la lipolyse adipocitaire, activent la thermogénine ou UCP1 qui permet le passage des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale ce qui inhibe la synthèse de l'ATP tout en activant la respiration (Gregory, 1989).

### **3.3. Membrane biologique :**

La membrane plasmique qui entoure les cellules est présente chez les procaryotes et les eucaryotes, qu'ils soient unicellulaires ou pluricellulaires. Sa fonction fondamentale est de délimiter le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire, c'est aussi une interface qui a une structure extrêmement mince (7 nm) et fluide. Elle est composée principalement d'une bicouche de molécules de phospholipides, de protéines (qui se déplacent dans la double couche de lipides à l'état fluide, et forment une mosaïque qui se modifie continuellement), de cholestérol et de courtes chaînes de saccharides qui sont à leur tour liées à des protéines ou des lipides formant ainsi des glycoprotéines et des glycolipides sur la face externe de la membrane plasmique. Le caractère amphiphile des phospholipides membranaires leur permet de s'organiser spontanément en milieu aqueux. Il se forme ainsi une double couche lipidique qui sépare donc deux milieux aqueux (Alberts *et al.*, 2002b).



La membrane plasmique joue un rôle important dans les processus de nutrition, de respiration et de sécrétion. En effet, de nombreux éléments tels que l'eau, les ions, les molécules organiques sont constamment échangés à travers la membrane cellulaire qui est hautement sélective. Elle est relativement imperméable à la majorité des molécules hydrosolubles, alors qu'elle est perméable à la majorité des molécules liposolubles (Alberts *et al.*, 2002a).

### 3.4. Médiateurs lipidiques :

A part leur rôle comme constituants structuraux des membranes biologiques, les phospholipides membranaires jouent un rôle de précurseurs de médiateurs lipidiques. Une fois hydrolysés par des enzymes lipolytiques spécifiques, ils donnent naissance à des médiateurs actifs. Les acides gras polyinsaturés, et plus particulièrement l'acide arachidonique, libérés des glycérophospholipides par l'action des phospholipases peuvent être métabolisés par deux voies principales pour former les eicosanoïdes :

- La voie de la cyclo-oxygénase qui conduit à la synthèse des prostanoïdes qui regroupent les prostaglandines et les thromboxanes.
- La voie des lipooxygénases qui conduit à la synthèse de divers produits bioactifs tels que les leucotriènes.

Les prostaglandines sont présentes dans la plupart des tissus et organes. Ce sont des molécules médiatrices lipidiques autocrines et paracrines qui agissent entre autres sur les plaquettes sanguines, l'endothélium, l'utérus et les mastocytes. Les thromboxanes sont de puissants inducteurs de la vasoconstriction et de l'agrégation plaquettaire. Les leucotriènes sont des molécules bioactives qui participent à la perméabilité vasculaire, à la contraction des muscles lisses et à la stimulation la vasoconstriction (De Caterina and Basta, 2001; Funk, 2001; Soberman and Christmas, 2003).

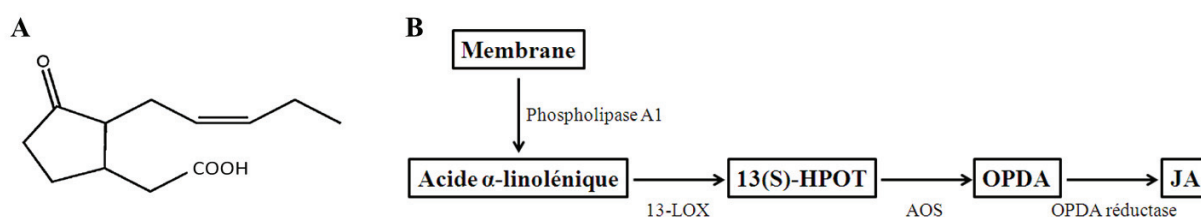
L'hydrolyse du PI-4,5-bisphosphate membranaire, par une phospholipase C, libère deux second messagers : un DG, qui est un médiateur hydrophobe, et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>), un médiateur soluble. Le DG reste dans la membrane cytoplasmique et induit une cascade de signaux en activant la protéine kinase C, alors que l'IP<sub>3</sub> active les canaux calciques dans le réticulum endoplasmique (Alberts *et al.*, 2002b).

L'hydrolyse des sphigomyélines, par une sphigomyélinase, libère de la phosphorylcholine et un céramide qui est un médiateur hydrophobe et qui est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires comme la régulation de la différenciation, la prolifération, la mort cellulaire programmée, et la migration-adhésion des cellules (Hannun and Obeid, 2008; Jenkins *et al.*, 2009).

Les médiateurs lipidiques régulent aussi divers mécanismes chez les plantes, comme la défense contre les pathogènes et les microorganismes et la lutte contre les différents stress (Khan *et al.*, 2013; Masood *et al.*, 2012). Parmi ces médiateurs on trouve l'acide jasmonique (JA) (**Figure 4 A**) qui joue un rôle très important dans la régulation des différents mécanismes cellulaires comme la germination, la croissance des racines, le développement de l'embryon,

la défense contre les pathogènes, le mouvement des feuilles etc. (Creelman and Mulpuri, 2002; Wasternack, 2014).

L'acide jasmonique est produit à partir de l'acide  $\alpha$ -linoléinique (18:3), libéré de la membrane lipidique par l'action d'une phospholipase A<sub>1</sub> (Ishiguro *et al.*, 2001). L'acide  $\alpha$ -linoléinique sera oxygéné par l'action de la lipoxigénase (LOX) pour former l'acide 13(S)-hydroxyperoxylinoléinique (13-HPOT), qui sera par la suite converti en acide 12-oxo-phytodiénoïque (OPDA) par l'action de l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC). L'OPDA est ensuite réduit par trois étapes de  $\beta$ -oxydation pour donner l'acide jasmonique (**Figure 4 B**) (Seo *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2000).



**Figure 4 :** Structure (A) et voie initiale de la synthèse (B) de l'acide jasmonique.

LOX : lipoxigénase ; HPOT : acide hydroxylinoléinique ; AOS : allène oxyde synthase ; OPDA : acide 12-oxo-phytodiénoïque ; JA : acide jasmonique.

L'acide jasmonique peut subir plusieurs modifications, comme une glycosylation, une réduction, une méthylation, ou une décarboxylation, pour donner des médiateurs qui interviennent dans les différents mécanismes et régulation chez les plantes.

### 3.5. Lipides ayant d'autres fonctions biologiques :

Ces lipides sont par exemple les coenzymes (comme le coenzyme A ou CoA, qui joue un rôle dans le transport des acides gras du cytoplasme à la mitochondrie pour l'oxydation, ou le coenzyme Q, également connu sous le nom d'ubiquinone, présent essentiellement dans les mitochondries, où il participe à la chaîne respiratoire (Ernster and Dallner, 1995), des hormones dérivées du cholestérol, des vitamines comme la vitamine D, des émulsifiants (phosphatidylcholine, acides biliaires) et des ancrs lipidiques des protéines.

## II. Les Lipases :

### 1. Introduction :

Les lipides constituent une grande partie de la biomasse, et les enzymes lipolytiques assurent le renouvellement métabolique de ces lipides. Ces enzymes peuvent être définies comme des biocatalyseurs de l'hydrolyse des fonctions esters carboxyliques ou phosphoriques des TG, DG, MG ou des phospholipides. Pour le biochimiste, l'aspect probablement le plus intrigant et le plus fascinant dans l'étude des enzymes lipolytiques est le caractère hétérogène de cette catalyse. Lorsqu'on étudie des enzymes, qui comme les lipases sont souvent solubles dans l'eau mais agissent à l'interface huile-eau, il faut tenir compte du partage de l'enzyme entre la phase aqueuse et la surface des LD. Longtemps considéré comme marginal, ce type de catalyse pourrait être prépondérant dans les cellules vivantes.

Les lipases, ou TG hydrolases (E.C.3.1.1.3), font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques (estérases carboxyliques). Elles catalysent l'hydrolyse des fonctions esters carboxylique des TG à longues chaînes et insolubles dans l'eau, mais elles hydrolysent également un grand nombre d'esters carboxyliques, totalement ou partiellement solubles dans l'eau. Elles peuvent être classées comme des carboxylester hydrolases lipolytiques pour les distinguer des carboxylester hydrolases non-lipolytiques (Aloulou *et al.*, 2012). Ces enzymes sont produites aussi bien par les microorganismes (bactéries, champignons, levures) que par les végétaux dans les graines oléagineuses, et par les animaux dans le tissu adipeux, les organes digestifs, etc. Les lipases sont également des catalyseurs très utilisés dans de nombreux procédés biotechnologiques fondés sur les réactions de synthèse d'esters, d'alcoolyse, d'acidolyse et de trans- et inter-estérification en milieu organique.

L'aspect le plus important de l'étude des enzymes lipolytiques comme les lipases est l'hétérogénéité de la catalyse qui se produit à l'interface lipide/eau, bien que souvent les lipases agissent spécifiquement sur des substrats lipidiques insolubles. Ces derniers s'organisent spontanément au contact de l'eau sous forme de films monomoléculaires ou multimoléculaires, de feuilletts lipidiques, de liposomes, d'émulsion ou de micelles (Small, 1968) (cf. I.2).

### 2. Spécificité des lipases :

La spécificité des lipases par rapport aux TG peut être subdivisée en trois catégories (Jensen *et al.*, 1983) :

- La typosélectivité : c'est la préférence ou spécificité d'une lipase pour un type d'acide gras donné.
- La régiosélectivité : cette spécificité concerne le pouvoir d'hydrolyser préférentiellement les liaisons esters carboxyliques en positions externes *sn*-1 et *sn*-3 (esters d'alcools primaires) vis-à-vis de la position interne *sn*-2 (esters d'alcool secondaire).
- La stéréosélectivité : c'est la capacité de discrimination entre deux énantiomères dans le cas d'un mélange racémique 1,2 et 2,3 -*sn* glycérols, ou la capacité de discrimination entre

deux groupements stéréohétérotopiques dans le cas des acylglycérols prochiraux (position *sn*-1 contre *sn*-3).

Ainsi, une lipase peut être régiosélective pour les fonctions esters primaires des TG, comme par exemple la lipase pancréatique humaine, la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) et la lipase de *Rhizopus arrhizus*, ou non régiosélective comme la lipase de *Candida rugosa* (Rogalska *et al.*, 1993a). La lipase de *Geotrichum candidum* hydrolyse avec une très grande sélectivité les liaisons esters contenant une insaturation *cis*- $\Delta^9$  montrant ainsi une typosélectivité par rapport à ce type d'acides gras et cela, quelle que soit leur position sur le glycérol. L'hydrolyse des groupements esters en position *sn*-2 est catalysée par très peu d'enzymes. Seule la lipase de *Candida antarctica* A a montré une préférence nette pour cette position (Rogalska *et al.*, 1993a). Aucune lipase purement spécifique de la position *sn*-2 n'est connue à l'heure actuelle.

La stéréosélectivité des lipases, tout comme leur activité spécifique, peut changer de façon considérable en fonction de l'hydrophobie du solvant utilisé (Gao *et al.*, 1997), de la tension interfaciale, de la longueur des chaînes acyles du TG substrat, du taux de lipolyse (Rodriguez *et al.*, 2008), de la composition chimique de l'interface et de la chiralité des molécules lipidiques non-substrat présentes dans le milieu.

La stéréosélectivité de nombreuses lipases d'origine animale, végétale et microbienne a été déterminée grâce à l'analyse de la configuration absolue des DAG libérés par l'hydrolyse de TAG homogènes mais de longueur de chaîne différente (trioctanoïne et trioléine) (Rogalska *et al.*, 1993b). Cette étude systématique a abouti à une classification des lipases totalement indépendante de leurs origines biologiques. La plupart des enzymes testées manifestent une préférence pour la position *sn*-1. Par contre, les lipases gastriques montrent une préférence pour la position *sn*-3. Il faut aussi noter l'inversion de stéréosélectivité de certaines lipases en fonction de la longueur des chaînes acyles du TG considéré.

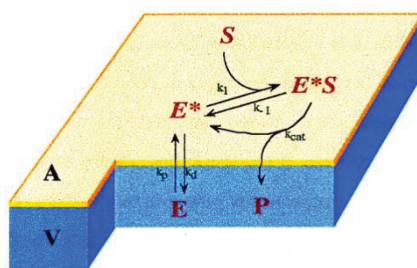
### 3. Modèle cinétique interfacial :

Pour rendre compte les propriétés particulières des lipases, le modèle classique de Henri-Michaelis-Menten utilisé dans l'enzymologie homogène (la réaction enzymatique se déroule avec enzyme soluble et substrat soluble) n'est plus applicable en milieu hétérogène où l'enzyme lipolytique agit à l'interface huile-eau.

Lorsqu'on étudie ces enzymes, qui sont solubles dans l'eau mais qui agissent à l'interface, il faut tenir compte du partage de l'enzyme entre la phase aqueuse et la surface des LD. Il faut également tenir compte de tous les phénomènes pouvant être liés à cette transition et à la physico-chimie de l'interface : changements conformationnels pouvant aller jusqu'à la dénaturation des protéines lors de leur adsorption, effet de la tension superficielle et organisation des lipides à l'interface, accumulation à l'interface des produits de la réaction ou d'autres molécules amphiphiles pouvant agir comme inhibiteurs ou accélérateurs des réactions enzymatiques, etc. C'est pour cela qu'un modèle cinétique interfacial plus adapté (**Figure 5**) a été proposé par Verger et de Haas (Verger and De Haas, 1973). Dans ce modèle, la réaction enzymatique peut être décomposée en deux étapes élémentaires :

(i) Une étape de fixation (adsorption et/ou pénétration) de l'enzyme à l'interface. Une des conséquences de l'étape d'adsorption est le changement dimensionnel de la concentration enzymatique. Cette réaction partielle est régie par deux constantes de vitesse  $k_p$  et  $k_d$  représentant respectivement l'adsorption et/ou la pénétration ( $k_p$ ) de l'enzyme à l'interface et la désorption ( $k_d$ ) de l'enzyme. Cette étape de fixation à l'interface peut, ou non, s'accompagner d'une cascade de changements conformationnels aboutissant à une activation de l'enzyme.

(ii) Une étape catalytique de l'enzyme, caractérisée par la formation d'un complexe enzyme-substrat ( $E^*S$ ) au sein de l'interface. Cette étape est analogue à une pseudo-réaction de Michaelis-Menten se déroulant en surface et non plus en solution.



**Figure 5 :** Modèle cinétique interfacial. E, enzyme en solution ;  $E^*$ , enzyme adsorbée à l'interface ;  $E^*S$ , complexe enzyme-substrat ; A, aire (surface lipidique) ; P, produit ; S, substrat ; V, volume aqueux ;  $k_{cat}$ , constante catalytique ;  $k_1$  : constante d'association enzyme-substrat ;  $k_{-1}$  : constante de dissociation enzyme-substrat ;  $k_p$  et  $k_d$  représentent respectivement la constante de pénétration et de désorption de l'enzyme à l'interface. (Verger and De Haas, 1973).

D'autres modèles cinétiques décrivant la catalyse enzymatique interfaciale pour des systèmes particuliers (micelles, vésicules) ont été également développés. L'un d'entre eux est celui du "modèle de dilution de surface" qui décrit la catalyse enzymatique de micelles mixtes (Carman *et al.*, 1995; Deems *et al.*, 1975). Ce modèle est assez proche du modèle proposé par Verger *et al.* (Verger and De Haas, 1973). L'enzyme soluble (E) s'associe tout d'abord à une micelle mixte détergent-lipide (A) pour former un complexe (EA). Une fois que cette étape est accomplie, la lipase fixe dans son site catalytique une molécule de lipide (B) pour donner le complexe Michaelien (EAB). À la suite de l'étape d'hydrolyse, les produits (P) sont libérés et le complexe EA est régénéré.

Un autre modèle développé par Jain *et al.* (Jain *et al.*, 1995) est celui adapté aux dispersions liposomales, appelé "scooting and hopping modes" de l'action enzymatique. Dans ce dernier modèle, deux cas extrêmes sont considérés. Dans le premier, dit "scooting mode", les molécules d'enzymes sont irréversiblement associées à la surface des vésicules et, par conséquent, la même molécule d'enzyme catalysera un très grand nombre de cycles d'hydrolyse. Dans le deuxième cas, dit "hopping mode", les molécules d'enzyme peuvent s'échanger rapidement entre les vésicules et la phase aqueuse, et la même molécule d'enzyme subit une étape de désorption / adsorption entre chaque cycle d'hydrolyse du substrat (Haiker *et al.*, 2004).

Il n'est toujours pas facile d'interpréter simplement les valeurs des constantes cinétiques déduites à partir des différents modèles cinétiques évoqués. Panaiotov *et al.* (Panaiotov *et al.*, 1997) ont publié une tentative d'unification et de généralisation des trois modèles cinétiques développés pour décrire la catalyse interfaciale de différentes structures lipidiques. Ces auteurs ont montré que ces modèles sont en fait interdépendants et déductibles d'un modèle général utilisant la "qualité interfaciale" comme paramètre cinétique unificateur.

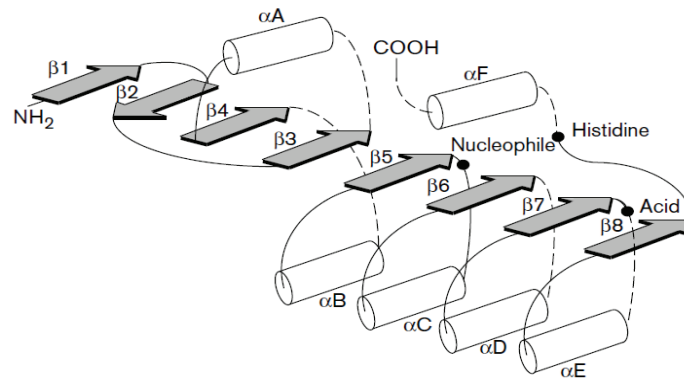
#### 4. Aspects structuraux des lipases :

C'est à partir des années 1990 que les premières structures tridimensionnelles (3D) de lipases, natives ou complexées à des inhibiteurs, ont été déterminées par diffraction aux rayons X. Il s'est tout d'abord agi de la structure 3D de la lipase du champignon filamentueux *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) et celle de la lipase pancréatique humaine (Winkler *et al.*, 1990). Depuis lors, ce sont plus de 60 structures 3D qui sont accessibles dans la base NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), parmi les structures récemment déterminées, on peut citer : la lipase B de *Candida antarctica* (Stauch *et al.*, 2015), la monoglycéride lipase humaine (hMGL) (Bertrand *et al.*, 2010), la lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica* (Bordes *et al.*, 2010) et la lipase *CAL-A type* ou UM03410 d'*Ustilago maydis* (Brundiek *et al.*, 2012). Bien que les séquences peptidiques montrent peu de similarités entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leurs origines, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure 3D (Ollis *et al.*, 1992) (Derewenda *et al.*, 1994). L'analyse de la relation séquence-structure-fonction de séquences de lipases répertoriées dans la base de données LED (Lipase Engineering Database ; <http://www.led.uni-stuttgart.de>) a permis de les classer en 16 superfamilles et 38 familles homologues (Fischer and Pleiss, 2003; Widmann *et al.*, 2010).

##### 4.1. Le repliement $\alpha/\beta$ hydrolase :

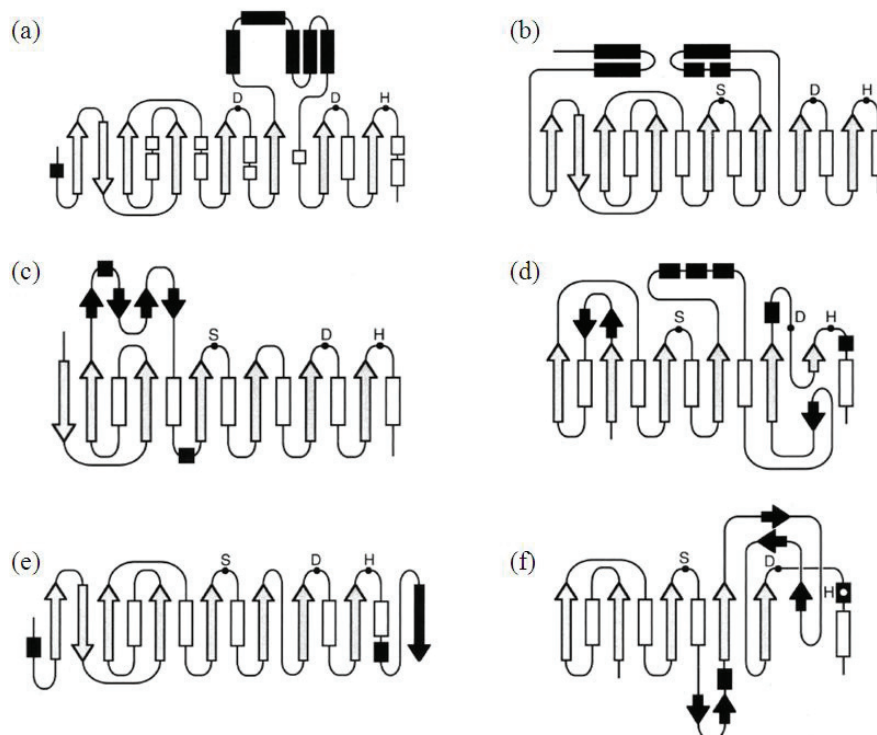
Toutes les lipases, de structure connue à ce jour, présentent, malgré des origines et des tailles différentes, une base structurale commune, composée, d'un feuillet  $\beta$  central, composé lui-même de 7 brins  $\beta$  parallèles et d'un brin antiparallèle, reliés entre eux par des hélices  $\alpha$ . Autour de ce domaine central viennent se greffer diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme ainsi que de sa spécificité de substrat. Une telle organisation 3D, nommée repliement  $\alpha/\beta$  des hydrolases ou « $\alpha/\beta$  hydrolase fold» (Ollis *et al.*, 1992) (Carr and Ollis, 2009; Nardini and Dijkstra, 1999) a été observée également dans d'autres enzymes, comme par exemple dans la haloalkane déhalogénase de *Xanthobacter autotrophicus* (Franken *et al.*, 1991), l'acétylcholine estérase de *Torpedo californica* (Sussman *et al.*, 1991), la carboxypeptidase II de blé (Liao and Remington, 1990) et la diénelactone hydrolase de *Pseudomonas* sp. B13 (Pathak *et al.*, 1988). Des enzymes non lipolytiques sont donc aussi regroupées dans la famille structurale possédant le repliement « $\alpha/\beta$  hydrolase». Ces enzymes ont peut-être divergé à partir d'un ancêtre commun dont le noyau central était formé d'un feuillet de 8 brins  $\beta$  connectés entre eux par des hélices  $\alpha$  (Figure 6).





**Figure 6 :** Structure secondaire du repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase (à partir de la publication (Nardini and Dijkstra, 1999)). Les feuillets bêta sont représentés par des flèches grises et les hélices alpha par des cylindres blancs. Les points noirs indiquent les positions des trois résidus catalytiques de la triade ; le résidu nucléophile peut être une sérine, une cystéine ou un acide aspartique et le résidu acide peut être un acide aspartique ou glutamique. La ligne pointillée indique la position des différentes insertions et modifications possibles dans le repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase pour différentes enzymes (cf. **figure 7**)

Après la résolution de la structure des différentes enzymes appartenant à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases, il a été clair que ce repliement peut avoir des modifications et des insertions dans sa structure qui diffèrent d'une enzyme à une autre (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Les variabilités de structure à l'intérieur du repliement hydrolase. Les différents schémas sont des représentations des structures résolues du repliement hydrolase des enzymes ; **(a)** : Epoxyde hydrolase de *A. radiobacter ADI*, **(b)** : Brefeldin A estérase de *B. subtilis*, **(c)** : Carboxylestérase de *Pseudomonas fluorescens*, **(d)** : Lipase de *P. aeruginosa*, **(e)** : Lipase de *S. exfoliatus*, **(f)** : Acetylxylyl estérase du *P. purpurogenum*. Les hélices alpha et les feuillets bêta du repliement initial sont représentés par des rectangles blancs et des flèches grises, respectivement, alors que les différences dans chaque structure sont représentées en noir. La localisation de la triade catalytique est présentée par des points noirs au niveau du résidu correspondant.



## 4.2. La triade catalytique :

Toutes les lipases comportent une triade catalytique dont l'ordre d'apparition des résidus dans la séquence primaire est identique : Ser-Asp/Glu-His. Cet ordre est différent de celui trouvé dans les protéases à sérine apparentées à la subtilisine ou à la trypsine (Warshel *et al.*, 1989). Les atomes de la triade catalytique impliqués dans le système de relais de charges sont cependant superposables à ceux des protéases à sérine (Derewenda and Cambillau, 1991). Le résidu nucléophile, *i.e.* la sérine, catalytique se situe toujours dans un coude serré situé à l'extrémité C-terminale d'un brin  $\beta$ , lequel est directement suivi d'une hélice  $\alpha$  (Warshel *et al.*, 1989; Winkler *et al.*, 1990) (**Figure 6**). Cette sérine possède, du point de vue énergétique, une conformation particulièrement défavorable appelée conformation epsilon, mais qui permet à sa chaîne latérale de pointer vers l'extérieur de ce coude dit « nucléophile » ( $\beta$ - $\epsilon$ Ser- $\alpha$ ) (Noble *et al.*, 1994; Ollis *et al.*, 1992; Schrag and Cygler, 1997). Cet emplacement fait de la sérine un résidu accessible au substrat et aux molécules d'eau. Cette sérine est incluse au centre d'un pentapeptide consensus Gly-X-Ser-X-Gly, où les résidus X correspondent à des acides aminés quelconques.

La région autour du pentapeptide présente une relative conservation. D'après la base de données PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) qui répertorie les motifs fonctionnels significatifs des protéines, la sérine catalytique (en gras souligné) des carboxylester hydrolases est incluse dans la séquence consensus F-[GR]-G-X<sub>4</sub>-[LIVM]-X-[LIV]-X-G-X-**S**-[STAG]-G. Le même résidu chez les lipases figure au sein de la séquence consensus suivante: [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-**S**-X-G-[GSTAC].

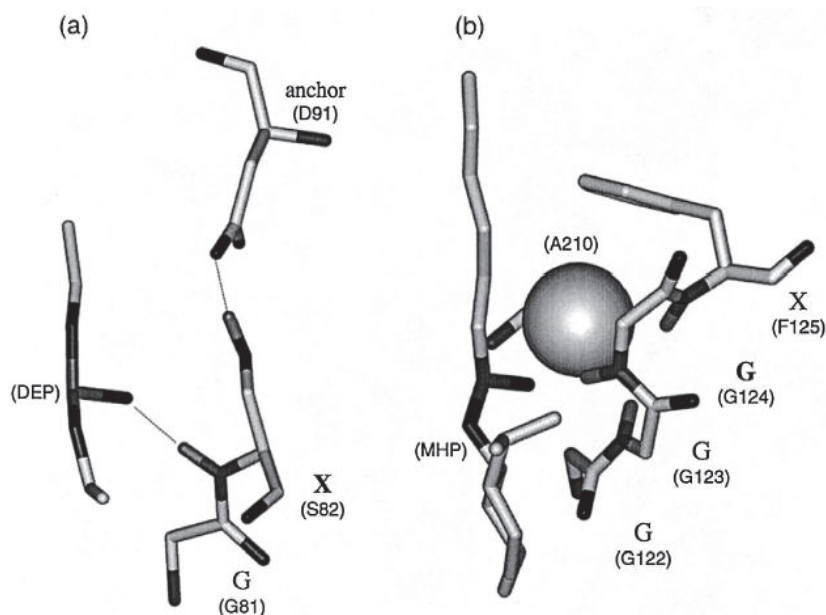
En ce qui concerne le résidu d'acide carboxylique de la triade catalytique, il est généralement situé à l'extrémité du 7<sup>ème</sup> brin  $\beta$  (**Figure 6**), sauf pour la lipase pancréatique où il est situé à l'extrémité du 6<sup>ème</sup> brin  $\beta$  (Winkler *et al.*, 1990). Dans certaines lipases de structure connue, ce résidu n'est pas un acide aspartique mais un acide glutamique. C'est le cas des lipases de *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991) ou de *Candida rugosa* (Derewenda *et al.*, 1994). Ce résidu peut être « assisté » dans son rôle stabilisateur de la charge positive, créé sur l'histidine lors de la réaction enzymatique, par un second résidu acide, c'est le cas dans la lipase de *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993, 1994). Dans cette enzyme, la mutation de l'acide aspartique de la triade catalytique (Asp283) en alanine n'entraîne pas la perte totale de l'activité de l'enzyme et on suppose que le groupement carboxylique du résidu Glu288 se substitue à celui de l'Asp 283.

L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxy-terminale du dernier brin du feuillet constituant le repliement  $\alpha/\beta$  (**Figure 6**).

## 4.3. Le trou oxyanionique :

Durant la réaction catalysée par les lipases, l'enzyme forme un intermédiaire tétraédrique avec son substrat (**cf. II.5**), qui sera stabilisé par au moins deux liaisons hydrogène, et formé par le groupement amide des chaînes carbonées. Les deux acides aminés intervenant dans cette stabilisation forment le trou oxyanionique.

Le premier résidu du trou se trouve dans la partie N-ter, et il est bien préservé dans les différentes familles de lipases ; il est localisé entre le troisième feuillet bêta et la première hélice alpha. Pleiss *et al.* ont identifié en 2000 (Pleiss *et al.*, 2000) deux types de trou oxyanionique ; en se basant sur la longueur de la séquence où se trouve le premier résidu, ils ont identifié le type GX et le type GGGX où X représente un acide aminé quelconque (**Figure 8**). Ils ont aussi remarqué que les lipases de type GX ont une spécificité pour des substrats à chaîne carbonée moyenne ou longue, alors que le type GGGX est plutôt pour les chaînes plus courtes.



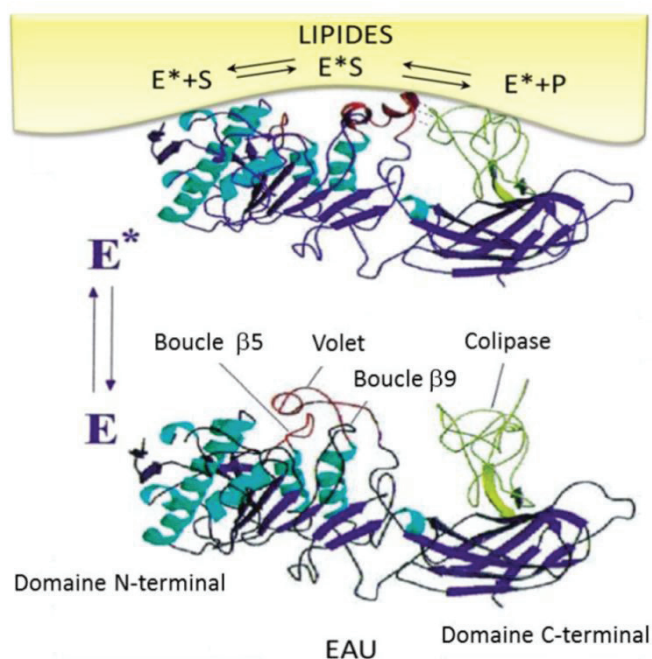
**Figure 8** : Illustration des deux types de trou oxyanionique. (a) : type GX ; enzyme 4TGL avec un inhibiteur le diéthylphosphate (DEP). On peut voir la liaison entre le premier résidu S82 du trou oxyanionique et le DEP. (b) : type GGGX ; lipase de *Candida rugosa* (1LPM) avec un inhibiteur, le 1R-méthyl hexyl phosphonate (MHP). Ici, on voit une liaison entre la glycine 124 et la MHP, de plus la chaîne latérale de l'alanine 210 et de la phénylalanine 125 renforcent la stabilité du trou oxyanionique. D'après (Pleiss *et al.*, 2000).

Le deuxième résidu du trou est le X2 qui se trouve dans la séquence nucléophile consensus G-X1-S-X2-G ; par exemple, pour la TG lipase de *Rhizomucor miehei* (PDB, 4TGL), c'est la leucine (GHSLG).

#### 4.4. Le volet amphiphile :

Le site actif de la plupart des lipases dont la structure a été élucidée n'est pas toujours accessible, il est recouvert par une boucle amphiphile, formée d'une ou plusieurs hélices alpha, appelée volet ou encore « lid », qui le rend inaccessible au solvant (et de ce fait, à tout substrat potentiel). Cette conformation est appelée forme « fermée » de l'enzyme, et elle est par conséquent supposée inactive. Dans le cas d'un certain nombre de lipases « à volet », la structure 3D a également pu être déterminée quand l'enzyme est co-cristallisée en présence d'un inhibiteur, d'un analogue de substrat ou de détergent (Brzozowski *et al.*, 2000; Derewenda *et al.*, 1994; Eydoux *et al.*, 2008; Grochulski *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1994; Schrag *et al.*, 1997). Ceci a permis de mettre en évidence l'existence d'une forme dite « ouverte » de l'enzyme : la sérine de la triade catalytique devient accessible au solvant suite au

mouvement du volet qui recouvrait auparavant le site actif. La face hydrophobe de ce volet amphiphile, orientée auparavant vers l'intérieur du site actif, s'expose alors au solvant, créant une surface hydrophobe à proximité du site actif, dont on suppose qu'elle interagit avec l'interface huile/eau (Roussel *et al.*, 2002; van Tilbeurgh *et al.*, 1993), (**Figure 9**). Le rôle du volet dans l'adsorption des lipases aux interfaces a été étudié par mutagenèse dirigée (Bezzine *et al.*, 1999; Jennens and Lowe, 1994; Lawson *et al.*, 1994; Martinelle *et al.*, 1996; Yang and Lowe, 2000). Cette nouvelle conformation de l'enzyme est aussi appelée forme active et est stabilisée par des forces de faible énergie avec deux autres boucles, appelées  $\beta 5$  et  $\beta 9$  (**Figure 9**). Les changements de conformation majeurs qui différencient les formes fermées et ouvertes concernent principalement ce volet amphiphile mais aussi parfois des boucles voisines et quelques résidus particuliers, impliqués notamment dans le trou de l'oxyanion. Certaines lipases, capables d'hydrolyser les glycérides à chaînes longues (par exemple la cutinase), ne possèdent pas de «volet».

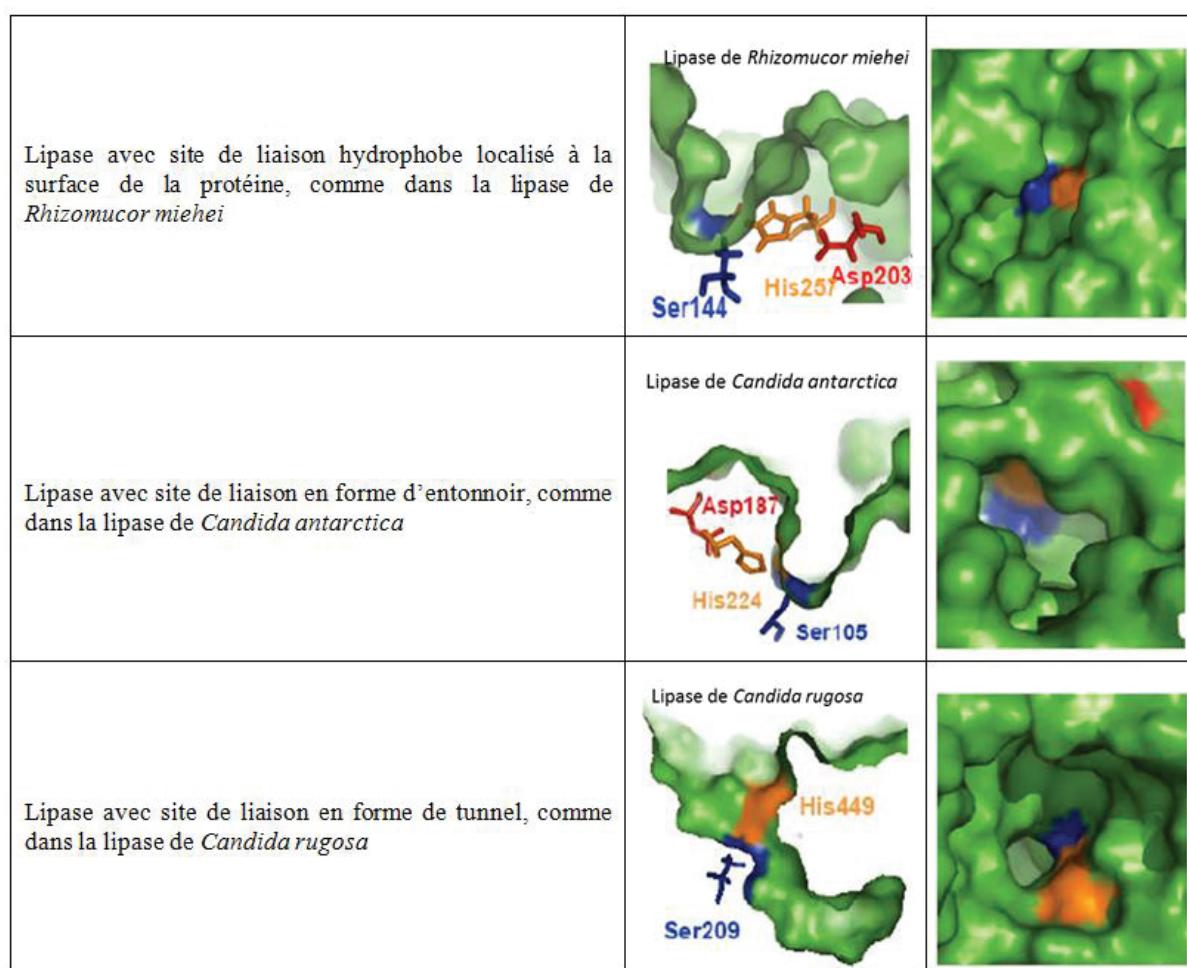


**Figure 9 :** Structure 3D de la lipase pancréatique humaine complexée avec son cofacteur, la colipase en conformation fermée ( $E$ ) et en conformation ouverte ( $E^*$ ). Ce diagramme montre le changement conformationnel du volet, des boucles  $\beta 5$  et  $\beta 9$ , ainsi que la colipase durant l'interaction de la lipase avec l'interface lipidique. D'après (van Tilbeurgh *et al.*, 1993).

#### 4.5. Le site de liaison au substrat :

Le site actif des lipases est localisé à l'intérieur de la structure protéique, et le substrat y a accès à travers un site de liaison localisé dans une poche à la surface du feuillet  $\beta$  central. S'il est vrai que les lipases partagent une conformation (repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase) identique, la région de liaison au substrat est considérablement différente d'une enzyme à une autre, surtout au niveau de la taille, de la structure et des caractéristiques physico-chimiques, en particulier ce qui concerne l'hydrophobicité des résidus de la poche. Une relation a aussi été montrée entre la taille, la forme, l'hydrophobicité du site de liaison au substrat et la longueur de la chaîne acyle (Pleiss *et al.*, 1998).

La structure résolue des lipases, en présence et absence des analogues lipidiques, a rendu possible l'identification du site de liaison des groupes acyles ( $-R-C=O$ ) et alkyles ( $-OR'$ ) des substrats ester. Le site de liaison au substrat pour les alkyles est similaire chez toutes les lipases ; c'est une pochette constituée de deux zones : i) une grande poche hydrophobe en amont de la sérine catalytique et ii) un petit acide aminé, souvent une sérine, en aval de la sérine catalytique qui peut être responsable de la stéréo-sélectivité des lipases pour les alcools secondaires. Alors que la topologie du site de liaison du groupement acyle varie considérablement d'une lipase à une autre, par exemple chez *Candida rugosa* ce site correspond à un long tunnel qui peut s'adapter aux longues chaînes de carbone, alors que chez *Rhizomucor miehei*, il est plus court et localisé à la surface de la protéine. D'après l'observation des différentes structures, trois topologies du site de liaison ont été proposées par Pleiss *et al.* (Pleiss *et al.*, 1998) (**Figure 10**) :

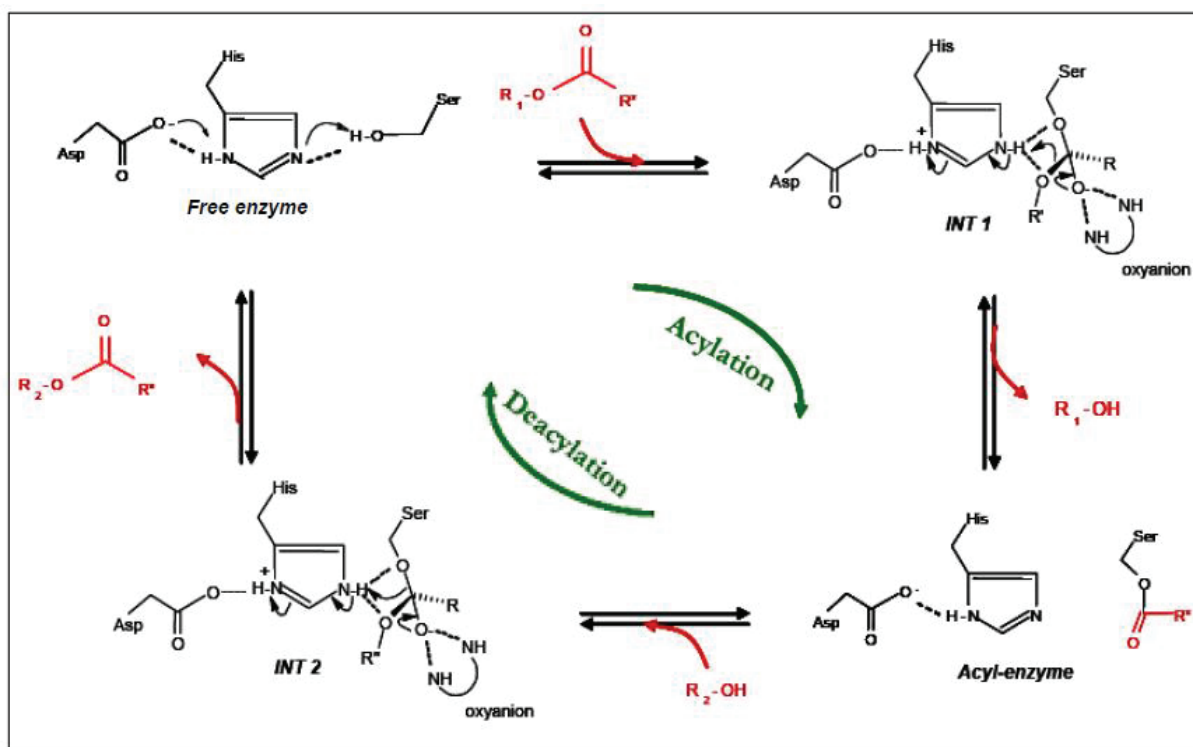


**Figure 10** : Trois topologies des sites de liaison des lipases. Les acides aminés de la triade catalytique sont colorés (Ser : bleu, Asp ou Glu : rouge, His : orange). Sur les images de droite, vue d'ensemble du site actif, et sur celles de gauche, zoom du site actif. (D'après (Pleiss *et al.*, 1998)).

## 5. Mécanisme d'action des lipases :

Le mécanisme d'action des lipases a été extrapolé à partir de celui de la chymotrypsine. Dans une première étape d'acylation, le groupement hydroxyle de la sérine nucléophile, activé par le réseau de relais de charges (induit par le transfert des protons entre l'acide

aspartique ou acide glutamique, l'histidine et la sérine), attaque le carbone de la fonction carboxylique du substrat pour former un premier intermédiaire tétraédrique (INT1) qui porte une charge négative sur l'oxygène du groupement carbonyle (**Figure 11**). Des liaisons hydrogène entre l'oxygène chargé négativement (oxyanion) de l'intermédiaire tétraédrique et des groupes N-H peptidiques stabilisent la charge négative de l'oxyanion. Cet environnement atomique et électronique est appelé trou oxyanionique (**cf. 4.3**). Ce trou stabilise la structure tétraédrique et donc abaisse l'énergie d'activation de la réaction. Au cours de cette catalyse nucléophile, la liaison ester carboxylique est rompue et le groupement alcool partant emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine. La chaîne acyle de la liaison ester du substrat reste liée de façon covalente à l'enzyme sous forme d'un intermédiaire acyl-enzyme (**Figure 11**). Cet intermédiaire acyl-enzyme est attaqué à son tour par une molécule d'eau pour donner un deuxième intermédiaire tétraédrique (INT2). Ce dernier se dissocie en libérant le groupement acyle partant, restituant ainsi la lipase dans son état initial. Dans les deux étapes d'acylation et de désacylation, le trou de l'oxyanion est nécessaire à la stabilisation des intermédiaires réactionnels (Malcata *et al.*, 1992).



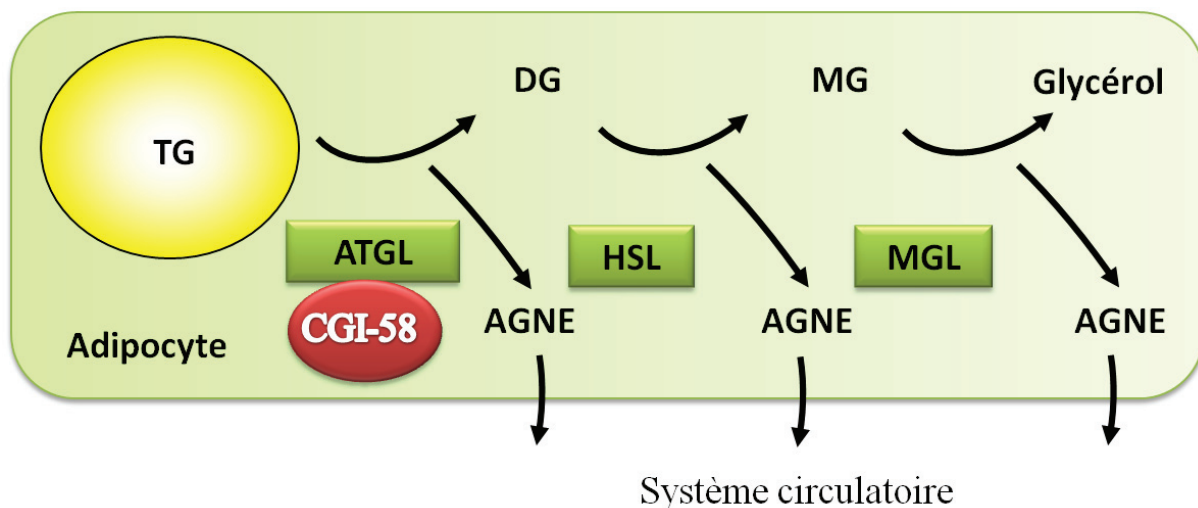
**Figure 11** : Mécanisme catalytique des lipases selon (Cygler *et al.*, 1992). INT1 et INT2 représentent, respectivement, le premier et le second intermédiaire tétraédrique.



### III. La Lipolyse Adipocytaire :

#### 1. Les enzymes lipolytiques du tissu adipeux :

Chez l'Homme, environ 95 % des TG de l'organisme se trouvent stockés dans le tissu adipeux blanc. Ce tissu, constitué essentiellement d'adipocytes, est capable de répondre à diverses hormones qui modulent l'accumulation (insuline) et la mobilisation (catécholamines) des TG (Brasaemle, 2007; Lafontan and Langin, 2009; Lass *et al.*, 2011). Dans certaines situations physiologiques (restrictions caloriques), l'hydrolyse des TG du tissu adipeux blanc est fortement augmentée afin de fournir aux organes les substrats énergétiques nécessaires. La mobilisation des TG dépend essentiellement de l'action de plusieurs enzymes lipolytiques synthétisées par les adipocytes (Lass *et al.*, 2011) : l'adipocyte TG lipase ou ATGL, la lipase hormono sensible ou HSL et la lipase des monoglycérides ou MGL ; ces enzymes sont impliquées respectivement dans l'hydrolyse des TG, DG et monoglycérides (MG) et libèrent les AGNE et le glycérol, qui sont ensuite délivrés dans le plasma et les tissus (**Figure 12**). Le tissu adipeux blanc est aussi le siège de mobilisation d'autres molécules lipophiles telles que les esters de rétinol et les esters de cholestérol.



**Figure 12 :** Représentation schématique de l'hydrolyse des TG, par les enzymes des adipocytes du tissu adipeux blanc (ATGL, HSL et MGL). **CGI-58** : cofacteur de l'ATGL.

Les AGNE issus de la lipolyse adipocytaire sont libérés dans le plasma où ils se lient à l'albumine. Certains acides gras polyinsaturés sont directement précurseurs de dérivés actifs tels que les eicosanoïdes (**cf. I.3.4**). Les AGNE libérés sont majoritairement métabolisés par le muscle squelettique et le muscle cardiaque *via* la  $\beta$ -oxydation. Les AGNE peuvent être ré-estérifiés en TG et être stockés temporairement dans le foie sous forme de LD ou redistribués dans les VLDL « very low density lipoproteins » vers la circulation sanguine. Ces VLDL vont être hydrolysées en AGNE sous l'action de la lipoprotéine lipase, synthétisée elle aussi par l'adipocyte.

La synthèse des TG dans le tissu adipeux peut résulter aussi de la lipogénèse *de novo* à partir du glucose. Cette voie de synthèse des TG, peu active chez l'Homme, est prédominante chez les rongeurs. Le glucose pénètre dans l'adipocyte grâce au transporteur Glut4 et se

métabolise, *via* la glycolyse, en pyruvate puis en acétyl-coenzyme A. Ce dernier se condense avec le malonyl-coenzyme A pour aboutir à des acides gras à longues chaînes grâce à l'acétyl coenzyme A carboxylase et l'acide gras synthase. Les AGNE, issus soit des lipoprotéines plasmatiques soit de la lipogénèse *de novo*, sont estérifiés sur le glycérol 3-phosphate, issu de la glycolyse, pour former les TG (cf. I.3.1.2.2).

### 1.1. La lipase hormono sensible HSL :

L'activité lipolytique de la HSL du tissu adipeux a été décrite pour la première fois en 1960 comme une activité dont les propriétés sont différentes de celles de la lipoprotéine lipase ou LPL (Rizack, 1964). Cette activité lipolytique fut par la suite attribuée à deux enzymes ayant des propriétés enzymatiques (spécificité de substrat et pH optimum) et une sensibilité aux hormones différentes : la HSL et la MGL (Vaughan *et al.*, 1964).

La HSL est une protéine de 775 acides aminés chez l'Homme (Contreras *et al.*, 1998). Elle hydrolyse toutes sortes d'acylglycérols (TG, DG et MG) ainsi que les esters de cholestérol et de rétinol (Lass *et al.*, 2011). Cependant son activité sur les DG est respectivement 10 et 5 fois plus élevée que sur les TG et les MG (Ben Ali *et al.*, 2004; Chahinian *et al.*, 2005). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus grâce à des souris invalidées pour le gène de la HSL, qui montrent une accumulation de DG dans les adipocytes de ces souris (Haemmerle *et al.*, 2002a; Osuga *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Il a été montré que la HSL a une préférence comme substrat pour la 2,3-*sn*-dioléine plutôt que pour la 1,2-*sn*-dioléine, montrant donc une stéréopréférence pour la position *sn*-3 (Rodriguez *et al.*, 2010).

La HSL joue un rôle important dans la mobilisation des esters de cholestérol. Osuga *et al.* ont montré que chez des souris invalidées pour le gène de la HSL (HSL<sup>-/-</sup>) le niveau de l'activité cholestérol estérasique au niveau des glandes surrénales est diminué de 98 % (Osuga *et al.*, 2000). Ceci montre que la HSL est une (cholestero)-lipase (Aloulou *et al.*, 2012) responsable de la quasi-totalité de l'activité ester de cholestérol estérasique. L'activité catalytique de la HSL en utilisant le cholestérol oléate comme substrat est environ 4-5-fois plus élevée que celle sur les TG à chaînes longues (Chahinian *et al.*, 2005). Cette activité catalytique importante observée *in vitro* sur les esters de cholestérol confirme l'importance physiologique de HSL dans le catabolisme des esters de cholestérol observée *in vivo* (Osuga *et al.*, 2000).

Bien que la structure 3D de la HSL ne soit pas encore déterminée, il a été proposé que son site actif soit formé par la triade catalytique : Ser423-Asp703 et His733 (Holm *et al.*, 2000). Plusieurs études biochimiques (Osterlund, 2001) ont montré que la HSL humaine comprend deux domaines principaux : le premier couvre la partie N-terminale de l'enzyme (acides aminés 1 à 320) et ne présente aucune homologie de structure primaire ou secondaire avec d'autres protéines connues, sa fonction reste largement hypothétique. Le second domaine, appelé domaine C-terminal, contient la triade catalytique (Ser, His et Asp) et les sites de phosphorylation. Sur la base de l'homologie de séquence en acides aminés entre le domaine C-terminal et la structure 3D de la bréfédine A estérase, une enzyme détoxifiante de *Bacillus subtilis*, (Wei *et al.*, 1999), il a été proposé que ce domaine possède un repliement du type  $\alpha/\beta$  et possède des similitudes structurales avec d'autres carboxylester hydrolases.



## 1.2. La lipase des monoglycérides MGL :

La MGL est nécessaire pour l'hydrolyse complète des MG (Fredrikson *et al.*, 1986). L'immunoprécipitation sélective de la MGL, dans le tissu adipeux conduit à une réduction de la libération du glycérol et une accumulation des MG (Fredrikson *et al.*, 1986). La MGL probablement catalyse aussi l'hydrolyse des MG, issus de l'action de la LPL sur les VLDL et sur les chylomicrons plasmatiques (Tornqvist *et al.*, 1978). La MGL a été purifiée d'abord à partir du tissu adipeux de rat (Tornqvist and Belfrage, 1976), puis sa séquence codante déduite de l'ADNc obtenue à partir du tissu adipeux de souris a été déterminée (Karlsson *et al.*, 1997). C'est une protéine de 302 acides aminés avec une masse moléculaire de 32,9 kDa. La structure 3D de la MGL (Bertrand *et al.*, 2010; Labar *et al.*, 2010) montre que cette enzyme appartient à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases et possède la séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly. Les résidus du site catalytique ont été identifiés comme étant la Ser122, l'Asp239 et l'His269 (Bertrand *et al.*, 2010; Karlsson *et al.*, 1997; Labar *et al.*, 2010).

La MGL est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus, avec une plus forte expression dans le tissu adipeux, les reins et les testicules (Karlsson *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été montré que la MGL est impliquée dans la dégradation du 2-arachidonoylglycérol, connu comme un puissant agoniste endogène des récepteurs cannabinoïdes (Dinh *et al.*, 2002).

## 1.3. L'ATGL, nouvelle TG lipase du tissu adipeux :

### 1.3.1. Historique :

Les expériences menées avec les souris invalidées pour le gène de la HSL (HSL<sup>-/-</sup>) ont montré une accumulation des DG et des esters de cholestérol dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et les testicules (Haemmerle *et al.*, 2002a; Haemmerle *et al.*, 2002b; Osuga *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'activité d'hydrolyse *in vitro* des TG dans le tissu adipeux brun ne semble pas être modifiée chez ces animaux, et la réponse thermogénique y est préservée (Osuga *et al.*, 2000). Dans le tissu adipeux blanc, l'activité basale d'hydrolyse *in vitro* des TG est préservée tandis que la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, n'est diminuée que de 60 % par rapport aux souris témoins (Osuga *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). *In vivo*, l'activité lipolytique mesurée par le taux de glycérol et des AGNE libérés chez les animaux HSL<sup>-/-</sup> reste toujours détectable (Osuga *et al.*, 2000).

Pris ensemble, ces résultats montrent (1) qu'au moins une TG lipase autre que la HSL doit être responsable de l'hydrolyse des TG en absence de la HSL ; (2) que cette nouvelle TG lipase montre une préférence pour l'hydrolyse de la première liaison ester de la molécule de TG; et (3) que la HSL est la seule enzyme responsable de l'hydrolyse des DG dans le tissu adipeux.

### 1.3.2. ATGL, iPLA2 $\zeta$ ou desnutrin, nouvelle TG lipase :

Zimmermann *et al.* ont décrit, grâce à leurs expériences sur les souris invalidées pour le gène de l'ATGL (ATGL<sup>-/-</sup>) (Zimmermann *et al.*, 2004), une lipase capable d'hydrolyser la

première chaîne acyle des TG, et fortement exprimée dans le tissu adipeux humain et de souris ; ils l'ont nommée la TG lipase du tissu adipeux ("Adipose Triglyceride Lipase" ou ATGL). Les ARNm de l'ATGL d'origine humaine et murine codent des protéines de 504 et 486 acides aminés, respectivement, avec 87 % d'identité (Zimmermann *et al.*, 2004).

Villena *et al.* (Villena *et al.*, 2004) avaient indépendamment et parallèlement décrit, chez le rat, une protéine putative (desnutrin) qui est principalement exprimée dans le tissu adipeux. La surexpression de cette protéine conduit à une hydrolyse accrue des TG. La surexpression de cette protéine dans les adipocytes 3T3-L1 montre une augmentation du taux d'hydrolyse des TG (Villena *et al.*, 2004). Cette protéine de 486 acides aminés est en réalité identique à l'ATGL.

Par ailleurs, Jenkins *et al.* (Jenkins *et al.*, 2004) ont mené une recherche dans les banques de données des protéines contenant à la fois la séquence consensus Gly/Ala-X-Gly-X-X-Gly, caractéristique des PLA<sub>2</sub> indépendantes du calcium (iPLA<sub>2</sub>), et la séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly, trouvée dans les carboxylester hydrolases. Ils ont identifié trois types de protéines nommées : iPLA<sub>2</sub> $\epsilon$ , iPLA<sub>2</sub> $\zeta$  et iPLA<sub>2</sub> $\eta$  précédemment appelées adiponutrin, TTS-2.2, et GS2, respectivement, et de fonction catalytique inconnue. Comme dans le cas de l'ATGL, ces 3 protéines contiennent un domaine « *patatin* » et catalysent le transfert de l'acide oléique d'une molécule de monooléine (donneur) à une molécule de mono- ou dioléine (accepteur). La iPLA<sub>2</sub> $\eta$  montre une activité de transfert plus élevée que les deux autres protéines. Ces trois protéines possèdent une activité d'hydrolyse significative sur les TG et il s'est avéré par la suite que la iPLA<sub>2</sub> $\zeta$  était également identique à l'ATGL.

### 1.3.3. Localisation de l'ATGL :

L'ATGL est localisée de façon abondante dans le tissu adipeux blanc et brun, mais aussi avec un taux plus faible dans d'autres tissus notamment le muscle (cardiaque et squelettique) et les testicules (Kershaw *et al.*, 2006; Lake *et al.*, 2005; Villena *et al.*, 2004; Zechner *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2004).

Des analyses par immunoempreinte sur des cellules d'adipocytes 3T3-L1, infectées par un adénovirus permettant la surexpression de l'ATGL, ont montré que la majorité de l'ATGL (50 %) est localisée dans le cytoplasme, une autre fraction (10 %) est fortement associée aux LD. Cette fraction n'est pas affectée par une stimulation de la lipolyse par l'isoprotérénol, (Zimmermann *et al.*, 2004). Dans les cellules Cos-7, qui présentent un taux faible de LD, l'ATGL est dans le cytoplasme (Villena *et al.*, 2004).

### 1.3.4. Données structurales sur l'ATGL :

Les ARNm de l'ATGL (NCBI code AK 031609) d'origine humaine (2,4 kb) et murine (2,6 kb) codent des protéines de 504 et 486 acides aminés, respectivement, avec 87 % d'identité (**Figure 13**). Des orthologues de l'ATGL ont été décrits dans d'autres espèces comme les levures, le cochon, les plantes, la mouche et la poule (Athenstaedt and Daum, 2005; Chen *et al.*, 2006; Eastmond, 2006; Gronke *et al.*, 2005; Saarela *et al.*, 2008). Le gène codant l'ATGL humaine (*PNPLA2*) est localisé sur le chromosome 11 en position 11p15.5 et

comprend 10 exons (Fischer *et al.*, 2007a; Fischer *et al.*, 2007b) et celui de la souris (*Pnpla2*) est localisé sur le chromosome 7F5 et comprend 9 exons (Zimmermann *et al.*, 2004).



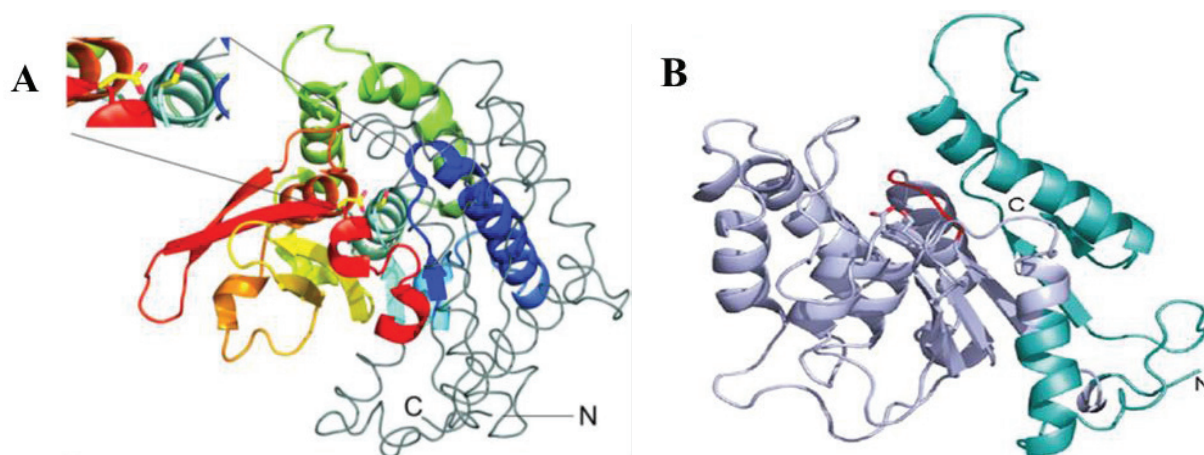
**Figure 13 :** Régions conservées et organisation des domaines de l'ATGL. Alignement des séquences de l'ATGL humaine et murine en utilisant le logiciel "T-Coffe Multiple Sequence Alignements" (Clamp *et al.* 2004 ; Kiefer *et al.* 2009). Les acides aminés identiques dans les deux séquences sont présentés sous forme de barre noire, et ceux différents en blanc. L'ATGL humaine (504 acides aminés) a été utilisée comme matrice. (D'après (Lass *et al.*, 2011)).

La région N-terminale de l'ATGL contient un domaine « *patatin* » (Pfam01734) de 186 acides aminés chez la protéine humaine, similaire à celui trouvé chez les acylhydrolases de plantes ; les membres de cette famille d'hydrolases jouent un rôle fondamental dans divers aspects du métabolisme et de la signalisation lipidique (Baulande and Langlois, 2010). Les domaines *patatin* sont généralement présents dans les protéines de stockage telles que la *patatin* Pat 17 de tubercule de pomme de terre (Shewry, 2003). Ces protéines ont été montrées comme ayant une activité acyltransférase sur les substrats phospholipidiques, les MG et les DG (Shewry, 2003). Les génomes humain et murin codent respectivement neuf et huit protéines contenant un domaine *patatin*. En 2006 cette famille de gènes a été nommée "*patatin-like phospholipase domain containing A 1-9*" (PNPLA1-9), l'ATGL étant la PNPLA2 (Wilson *et al.*, 2006). Les PNPLA1-9 agissent comme des TG hydrolases, phospholipases, retinyl esterases et acyltransférases (Kienesberger *et al.*, 2009; Kumari *et al.*, 2012; Rajakumari and Daum, 2010). La protéine la plus proche de l'ATGL parmi les membres de la famille PNPLA1-9 est l'adiponutrine (PNPLA3) (Baulande *et al.*, 2001), qui a été décrite comme ayant une activité TG hydrolase et acyltransférase (He *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Les domaines *patatin* sont également présents dans d'autres enzymes d'origine fongique, végétale, animale ou microbienne (Banerji and Flieger, 2004). On les retrouve par exemple, dans la TGL3, une TG lipase de *Saccharomyces cerevisiae* (Athenstaedt and Daum, 2003) et dans la PLA<sub>2</sub> cytosolique humaine (Dessen *et al.*, 1999). Les structures 3D résolues de la *patatin* du tubercule de la pomme de terre (Pat 17) (Rydel *et al.*, 2003) (**Figure 14 A**) et de la PLA<sub>2</sub> cytosolique (Dessen *et al.*, 1999) ont indiqué une nouvelle topologie avec une diade catalytique Ser-Asp peu commune chez les lipases. Il a été montré (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003) qu'ExoU, un facteur de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* possédant une activité lipase et phospholipase de type A, contient aussi un domaine "*patatin*" avec une diade catalytique Ser/Asp. En utilisant l'homologie de séquence entre l'ATGL et les deux protéines à domaine *patatin* (Pat 17 et PLA<sub>2</sub> cytosolique), il a été suggéré que la diade catalytique de l'ATGL implique la Ser 47 et l'Asp 166 (Rydel *et al.*, 2003). Il a été montré

plus tard que le remplacement en alanine par mutagenèse dirigée de l'un de ces deux résidus abolit l'activité enzymatique (Duncan *et al.*, 2010; Lass *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2008).

En plus du domaine "patatin", la modélisation structurale de l'ATGL humaine révèle la présence, dans la région N-terminale, du pentapeptide Gly-X-Ser-X-Gly (dans laquelle X représente un acide aminé quelconque) contenant le résidu Ser 47 catalytique trouvé dans la séquence des carboxylester hydrolases à sérine (**Figure 13 et 14 A**) (Schrage and Cygler, 1997). Ce site actif situé dans le domaine *patatin* est intégré dans un repliement  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  (COG1752) de 250 acides aminés. D'autres domaines ont pu être identifiés sur la séquence en acides aminés de l'ATGL (Zechner *et al.*, 2009). Une partie de la séquence, riche en acides aminés hydrophobes entre l'acide aminé 315 et 360, est localisée dans la partie C-terminale de l'enzyme, pourrait être responsable de la liaison aux lipides (**Figure 13 et 14 A**) (Kobayashi *et al.*, 2008; Schweiger *et al.*, 2008). Cette fonction primordiale a été prouvée par le fait qu'une protéine ATGL ayant perdu ce domaine peut hydrolyser des émulsions de TG *in vitro* mais ne se lie pas aux LD *in vivo* dans les cellules (Duncan *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2008; Schweiger *et al.*, 2008).



**Figure 14 :** Structure 3D de la Pat17 illustrant des similitudes de séquence avec l'ATGL humaine (A) et modèle de la région Met1-Leu254 de l'ATGL murine, basé sur l'homologie de séquence avec les protéines Pat17 et cPLA<sub>2</sub> (B).

**A.** La région de l'ATGL humaine, communément annotée «domaine patatin de l'ATGL » (Ile10-Lys179), partage des homologies de séquences avec Pat17 (Leu32-Ser228). La structure 3D de cette séquence dans Pat17 est montrée en couleur. Le reste de la structure 3D de Pat17 est représentée en gris. N et C indiquent, respectivement, les extrémités N- et C-terminales. L'insert montre la diade catalytique de Pat17, avec les résidus Ser77 et Asp215 (correspondant à Ser47 et Asp166 dans l'ATGL humaine) colorés en jaune. (D'après (Lass *et al.*, 2011)).

**B.** La partie en gris représente les résidus Met1 jusqu'à Lys179 ; la partie en vert représente les résidus Lys180 jusqu'à Leu254. Les résidus Ser47 et Asp166 (résidus potentiels de la diade catalytique) ainsi que les résidus potentiels du trou oxyanionique sont représentés en rouge. D'après (Cornaciu *et al.*, 2011).

Cornaciu *et al.* (Cornaciu *et al.*, 2011) ont déterminé le domaine minimal pour une activité de l'ATGL comme étant composé de la partie N-terminale de la protéine jusqu'à la Leu254 (**Figure 14 B**). Ce domaine peut toujours être activé et inhibé par les protéines CGI-58 et G0S2, respectivement, et il est suffisant pour une interaction protéine-protéine entre l'ATGL et ces protéines régulatrices. Les auteurs ont trouvé aussi que la troncature du

domaine C-ter de l'ATGL, exprimée dans *E. coli*, augmente son activité lipase *in vitro* et son activation par la protéine CGI-58, en comparaison avec l'ATGL sauvage.

Il semble donc que c'est la partie N-terminale de l'ATGL, contenant le domaine patatin et la diade catalytique composée des deux résidus Ser47 et Asp166, qui soit responsable de l'activité lipase de l'enzyme et de son interaction avec les protéines CGI-58 et G0S2, indépendamment de la partie C-terminale. D'autres études ont montré des rôles putatifs de la partie C-terminale, qui semble être responsable, par la partie hydrophobe comprise entre Val315 et Ile365, de la localisation de l'ATGL à la surface des LD (Kobayashi *et al.*, 2008; Schweiger *et al.*, 2008). Un autre rôle d'autorégulation négatif par le domaine C-terminal de l'ATGL a été proposé vu que des mutants tronqués de la partie C-terminale montrent une augmentation de l'activité TG hydrolase *in vitro* (Kobayashi *et al.*, 2008; Schweiger *et al.*, 2008), de plus Duncan *et al.* (Duncan *et al.*, 2010) ont rapporté une interaction entre les domaines N-terminal et C-terminal de l'ATGL ce qui pourrait expliquer cette autorégulation de la protéine.

### 1.3.5. L'importance et la fonction de l'ATGL :

Comme déjà mentionné, l'ATGL est exprimée majoritairement dans les tissus adipeux blanc et brun, et de façon plus modérée dans le cœur, les testicules, le muscle squelettique mais aussi dans le foie chez la souris (Villena *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004). Le rôle important de l'ATGL dans le catabolisme des TG est devenu évident avec l'examen des souris déficientes en ATGL (ATGL<sup>-/-</sup>) et l'étude des maladies associées aux mutations du gène codant l'ATGL (Fischer *et al.*, 2007a; Haemmerle *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2009). L'absence d'ATGL chez la souris est associée à une lipolyse sévèrement réduite entraînant des dépôts de graisse dans pratiquement tous les tissus de l'organisme, plus particulièrement dans les tissus hautement oxydatifs, comme les muscles cardiaques, le tissu adipeux brun, les testicules, et les reins. Le dépôt massif de graisse dans le cœur provoque un dysfonctionnement cardiaque et la mort prématurée de l'animal après 12 semaines (Zimmermann *et al.*, 2004).

De plus, le test oral de tolérance au glucose, montre que les souris ATGL<sup>-/-</sup> affichent une tolérance au glucose nettement améliorée par rapport aux souris sauvages. Ceci va dans le sens que le taux d'AGNE dans la circulation est considéré comme responsable de la diminution de la sensibilité à l'insuline (Holm *et al.*, 2000). De plus, les mâles ATGL<sup>-/-</sup> sont certes fertiles, mais les femelles sont incapables d'allaiter leur progéniture à cause de la diminution de la production de lait. Il a été aussi remarqué que les concentrations en AGNE, TG, cholestérols, HDL-cholestérol et cétone sont plus faibles dans les souris ATGL<sup>-/-</sup> qu'elles soient alimentées ou à jeun (Haemmerle *et al.*, 2006).

Des déficits de dégradation des TAG cytoplasmiques peuvent aboutir à une accumulation de TAG sous forme de LD : ces maladies sont désignées sous le vocabulaire de maladies de stockage de lipides neutres ou Neutral Lipid Storage Disease (NLSD).

La NLSD est une maladie autosomique récessive (Chanarin *et al.*, 1975), les individus affectés accumulent des vésicules de TAG dans plusieurs tissus comme la peau, les muscles,



le cœur, le foie et les leucocytes. D'autres symptômes peuvent apparaître comme la stéatose du foie, l'hépatomégalie, une myopathie cardiaque et squelettique, un retard de croissance, des cataractes et des pertes d'audition (Chanarin *et al.*, 1975; Dorfman *et al.*, 1974). Un des phénotypes le plus évident chez un patient avec NLSD est un défaut de perméabilité dans la barrière épidermique, appelé syndrome de Chanarin-Dorfmann ou CDS, est également appelé aujourd'hui NLSDI ou NLSD avec ichtyose. La NLSDI ou CDS est due à des mutations de la protéine CGI-58 (ABHD5) (Fischer *et al.*, 2007b; Lefevre *et al.*, 2001) (**Tableau 2**).

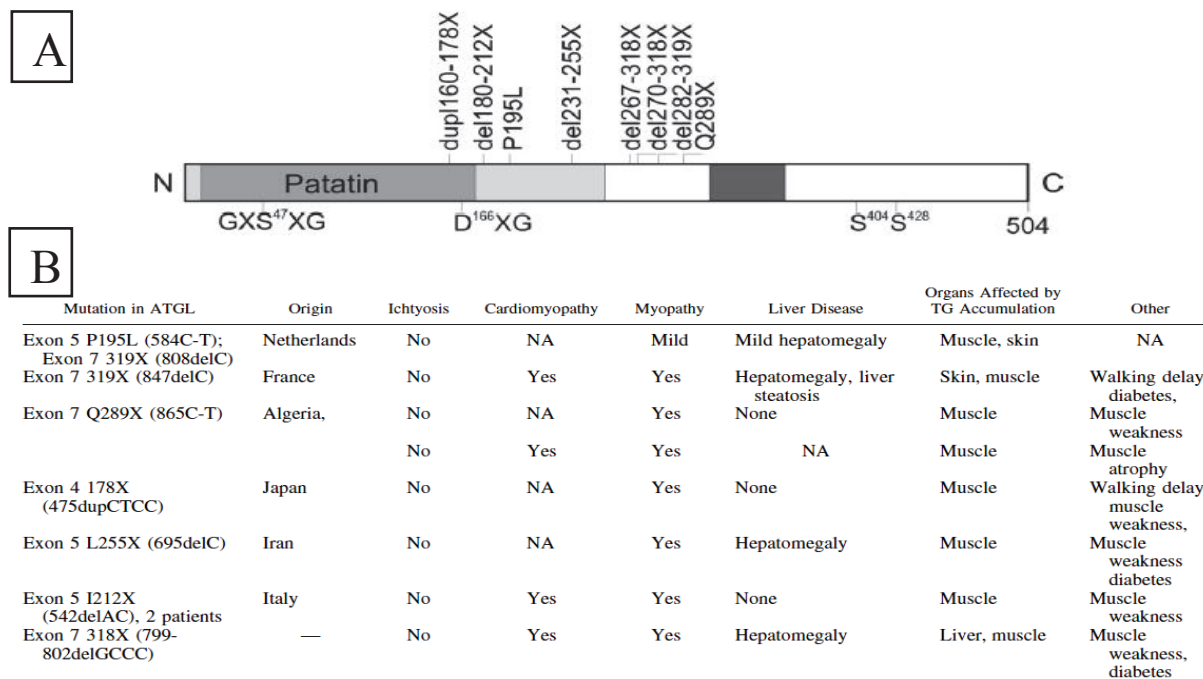
**Tableau 2 :** Phénotype des patients atteints de NLSM ou de NLSDI. \* Symptômes les plus fréquents ou constants dans la NLSD (donc communs aux deux entités, NLSM et NLSDI). \*\* Symptôme (ichtyose) et génétique (anomalies génétiques, mutations dans la séquence) discriminants entre les 2 maladies. ni : non indiqué. <sup>1</sup> Enzymes anormales (muscle [Créatine phosphokinase] et foie [Transaminases,  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase, Lactate deshydrogénase, Phosphatase alcaline]). <sup>2</sup> Anomalies de l'électroencéphalographie, divers. D'après (Fischer *et al.*, 2007b).

	Fréquences des symptômes (%)	
	NLSM	NLSDI/CDS
Accumulation des TG ( <i>neutral lipid storage</i> )*		
• Leucocytes (anomalie de Jordans)*	100	100
• Muscle et divers tissus*	100	100
Symptômes cliniques		
• Icthyose**	0	100
• Myopathie modérée* - clinique	100	55-60
- Enzymes* <sup>1</sup>	100	88-100
• Cardiomyopathie - clinique	33	ni
- ECG <sup>2</sup>	66	ni
• Foie - hépatomégalie	50	50
- Enzymes* <sup>1</sup>	100	100
• Retard de la marche	66	ni
• Retard mental modéré	33	40
• Symptômes ophtalmologiques	0	60
• Surdité	0	40
• Retard de croissance et petite taille	66	25
• Microcéphalie	0	15
• Splénomégalie	0	24
• Diabète	33	0
• Pancréatite chronique	33	0
• Symptômes intestinaux	33	9
Génétique**		
• ATGL	muté	non muté
• CGI-58	non muté	muté
Biochimie - accumulation de TG	100	100

Igal *et al.* (Igal *et al.*, 1997), dans une expérience, ont groupé plus de 40 patients avec NLSD en deux groupes en basant sur la présence ou non d'une ichtyose, et ils ont remarqué que les patients sans ichtyose ont plus de probabilités d'avoir des myopathies cardiaques et squelettiques. C'est pour cela qu'aujourd'hui les NLSD sans ichtyose sont appelées NLSM ou NLSD avec myopathie.

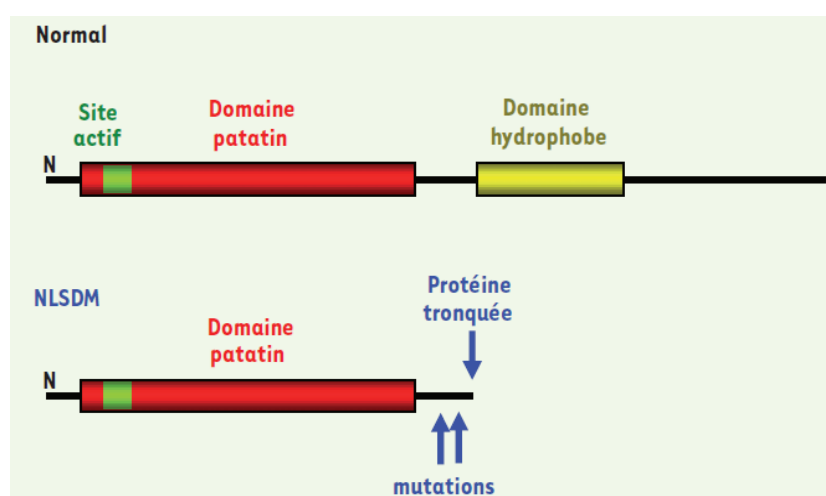
En 2007, Fischer *et al.* (Fischer *et al.*, 2007a) ont rapporté que des mutations de l'ATGL (PNPLA2) cause la NLSM, et depuis cette date, plusieurs patients humains avec NLSM ont été décrits, ainsi que plus de 15 mutations différentes. Ces mutations comprennent des

délétions d'un unique, deux ou quatre nucléotides, des transversions et des altérations des sites d'épissage (Schweiger *et al.*, 2009) (**Figure 15**).



**Figure 15 :** **A :** Représentation des différents domaines de l'ATGL avec la position des différentes mutations. **B :** Tableau récapitulatif des mutations trouvées dans la NLSDM avec les symptômes associés. D'après (Schweiger *et al.*, 2009).

La plupart de ces mutations aboutissent à des codons stop au centre du gène dans sa partie codante. L'analyse des mutations chez ces patients montre que ces mutations aboutissent donc à des protéines tronquées, avec une perte du domaine hydrophobe de liaison aux lipides, mais avec conservation du domaine *patatin* qui contient le site actif de la lipase (**Figure 16**) (Fischer *et al.*, 2007b).



**Figure 16 :** Domaines fonctionnels de la lipase ATGL (PNPLA2) chez le sujet normal et chez les patients atteints de NLSDM. D'après (Fischer *et al.*, 2007b).



En général le phénotype humain de NLSDM ressemble au phénotype de souris ATGL<sup>-/-</sup> mais il est moins dramatique. Les patients affectés décrivent des fatigues musculaires pendant leur adolescence ; dans leur troisième décennie les patients développent des stéatoses cardiaques et des cardiomyopathies ; ces conditions peuvent être sévères et nécessitent la plupart du temps des transplantations cardiaques (Hirano *et al.*, 2008).

#### ***Dans les muscles cardiaques :***

L'organe le plus affecté en cas de déficience de l'ATGL est le cœur, on y observe une accumulation plus importante des TAG que dans les autres organes et une augmentation de la taille des mitochondries (Haemmerle *et al.*, 2011). Il a été reporté en 2004 que le dépôt massif de graisse provoque un dysfonctionnement cardiaque et la mort prématurée de l'animal (Zimmermann *et al.*, 2004). En 2011, grâce à des souris déficientes en ATGL dans tous les tissus sauf les muscles cardiaques (ATGL-ko/CM) générées par Schoiswohl *et al.* en 2010 (Schoiswohl *et al.*, 2010), Haemmerle *et al.* ont montré que le dysfonctionnement cardiaque des souris ATGL<sup>-/-</sup> n'est pas dû à l'accumulation des TG mais plutôt à la détérioration des mitochondries cardiaques (Haemmerle *et al.*, 2011). Les auteurs proposent le mécanisme suivant : après leur entrée dans cellules, les AGNE sont ou bien oxydés dans les mitochondries ou bien ré-estérifiés et stockés dans les LD. L'hydrolyse des TG par l'ATGL est essentielle pour fournir les ligands nécessaires pour l'activation du complexe PPAR $\alpha$  / PGC-1 (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha / PPAR Gamma Coactivator 1*), qui par la suite active la biogénèse et la phosphorylation oxydative des mitochondries. Le traitement des souris ATGL<sup>-/-</sup> par des agonistes de PPAR $\alpha$  permet la survie des souris (Haemmerle *et al.*, 2011). Ces données ouvrent la possibilité de traitement des patients NLSDM par des agonistes de PPAR.

#### ***Dans les muscles squelettiques :***

En comparaison avec les tissus non adipeux, l'expression des ARNm de l'ATGL dans les muscles squelettiques est importante (Zimmermann *et al.*, 2004). Les données des souris ATGL<sup>-/-</sup> ou surexprimant l'ATGL montrent un rôle important et primordial de l'ATGL dans le métabolisme des lipides et de la production d'énergie dans les muscles squelettiques (Alsted *et al.*, 2009; Haemmerle *et al.*, 2006; Watt *et al.*, 2008). Le muscle squelettique est le tissu le plus consommateur d'AGNE, surtout lors d'efforts physiques (Watt *et al.*, 2008), il a été montré que durant les premières semaines d'exercice, la taille des mitochondries peut augmenter de 50 % dans les muscles squelettiques (Gollnick and King, 1969; Hoppeler and Fluck, 2003; Rowe *et al.*, 2012), et que l'ATGL est essentielle pour hydrolyser les TG intramyocellulaires et pour fournir les AGNE nécessaires à la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Huijsman *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2012; Schoiswohl *et al.*, 2010). En l'absence d'ATGL chez les souris il se produit une augmentation du métabolisme des sucres, et donc une diminution du glycogène du foie et des muscles avec une diminution de l'endurance et de la capacité oxydative des mitochondries (Huijsman *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2012).

### ***Dans le foie :***

Des résultats sensiblement différents ont été publiés sur l'accumulation des TG dans le foie chez des souris déficientes en ATGL, avec des valeurs soit identiques (Fuchs *et al.*, 2012), soit 2,3 fois (Haemmerle *et al.*, 2006) ou 3 fois plus importantes (Wu *et al.*, 2011) que les valeurs normales. Watt *et al.* (Watt *et al.*, 2008) ont montré que l'absence d'ATGL dans le foie provoque une stéatose sans altérer la sensibilité à l'insuline (Ong *et al.*, 2013), et sans inflammation (Wu *et al.*, 2011) par rapport aux autres types de stéatose induite par l'obésité. De plus, la déficience en ATGL dans le foie provoque une diminution de 40 à 70 % des ARNm des PPAR $\alpha$  et de leurs gènes cibles, et une réduction de la  $\beta$ -oxydation, sans altérer la sécrétion des VLDL (Ong *et al.*, 2011). Par contre, le traitement des cellules par des agonistes de PPAR $\alpha$  ne compense pas l'absence d'ATGL, ce qui suggère une régulation ligand-PPAR indépendant par l'ATGL dans le foie.

### ***Dans le tissu adipeux :***

Les souris ATGL<sup>-/-</sup> présentent des accumulations de dépôts lipidiques dans le tissu adipeux, plus prononcés dans le tissu adipeux brun que dans le tissu adipeux blanc (Haemmerle *et al.*, 2006). Les AGNE libérés dans le tissu adipeux brun sont utilisés pour la thermogénèse (Nicholls and Rial, 1999), c'est pour cela que la déficience en ATGL aboutit à l'absence de cette activité productrice de chaleur. Chez ces souris mutantes, on remarque aussi une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des AGNE (Pinet *et al.*, 2008) et une inhibition des gènes cibles du PPAR $\alpha$  (Ahmadian *et al.*, 2011). Des travaux de Motillo *et al.* en 2012 montrent que l'ATGL est nécessaire pour l'activation des gènes impliqués dans l'oxydation des AGNE, et pour le transport d'électrons dans les mitochondries du tissu adipeux brun (Motillo *et al.*, 2012).

Toujours chez ces souris ATGL<sup>-/-</sup>, dans le tissu adipeux blanc, la lipolyse hormone-stimulée est considérablement réduite, indiquant un mécanisme de régulation hormonale, directement ou indirectement lié à l'activité de l'ATGL ; de plus on remarque une réduction de la fonction mitochondriale et une augmentation des stress au niveau du réticulum endoplasmique, caractérisé par l'augmentation de protéines mal-repliées (Ozcan *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 2008).

### **1.3.6. Surexpression et propriétés enzymatiques de l'ATGL :**

Les travaux de (Jenkins *et al.*, 2004; Villena *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004) ont indiqué que l'ATGL a une préférence pour l'hydrolyse de la liaison ester en position *sn*-1 des molécules de TG à longues chaînes hydrocarbonées. La surexpression de l'ATGL dans les cellules Cos-7 augmente la libération des AGNE libres dans le milieu et diminue la réserve intracellulaire des TG sans affecter l'accumulation des phospholipides intracellulaires (Villena *et al.*, 2004). Un effet similaire sur le taux des TG est aussi observé dans les cellules 293 HEK (Lake *et al.*, 2005) tandis que l'expression de l'ATGL dans les adipocytes 3T3-L1 est marquée par l'augmentation de la libération de glycérol et d'AGNE (Zimmermann *et al.*, 2004). *In vitro*, une activité TG hydrolase a été démontrée pour l'enzyme exprimée dans les

cellules d'insectes Sf9, les cellules 293 HEK ainsi que les cellules Cos-7 (Jenkins *et al.*, 2004; Villena *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004).

Zimmermann *et al.* (Zimmermann *et al.*, 2004) ont préparé des extraits cytosoliques de cellules HepG2, infectées par l'adénovirus-ATGL, et les ont incubés avec de la trioléine et de la dioléine radiomarquées. Ces auteurs ont observé une activité TG lipase environ 6 fois plus élevée que l'activité DG lipase, indiquant un rôle primaire de l'enzyme dans la catalyse de la première réaction limitante de la cascade d'hydrolyse des TG. Ces résultats ont été confirmés par des travaux dans les cellules Cos-7 démontrant une élévation de presque 21 fois des DG dans les cellules transfectées avec l'ATGL, et ceci en comparaison avec des cellules transfectées par la HSL (Zimmermann *et al.*, 2003) (Zimmermann *et al.*, 2004).

L'ATGL semble aussi avoir un rôle dans la régulation nutritionnelle grâce à son pouvoir dans la mobilisation des TG de réserve en réponse à une demande d'énergie accrue. L'équipe de Villena (Villena *et al.*, 2004) a montré que l'expression de l'ATGL/desnutrin est stimulée chez les souris dépourvues d'alimentation, alors que l'expression est inhibée en cas de réalimentation.

Contrairement à la HSL, l'ATGL montre une très faible activité sur les DG par rapport à son activité sur les TG. Elle catalyse préférentiellement l'hydrolyse de la 1<sup>ère</sup> liaison ester des TG, libérant des DG et des AGNE (120 nmol d'AGNE formé par mg d'enzyme par heure) (Lass *et al.*, 2006). Par comparaison à son activité hydrolytique sur les TG, l'ATGL possède une activité 10 fois moindre sur les DG, les MG, les esters de cholestérol et esters de rétinols (Zimmermann *et al.*, 2004). De plus, il a été rapporté que l'ATGL possède d'autres activités mesurables, et notamment une activité PLA<sub>2</sub> (estimée à 5,2 nmol d'AG libéré / min / mg d'enzyme) (Notari *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2004), ainsi qu'une activité DG transacylase (4,5 nmol de TO formé / min / mg d'enzyme) (Jenkins *et al.*, 2004; Lake *et al.*, 2005) qui génère une molécule de TG et une molécule de MG, à partir de deux molécules de DG, d'une manière ainsi indépendante de la voie classique utilisant l'acyl-coenzyme A et la DGAT (Jenkins *et al.*, 2004).

Dans l'hydrolyse des TG, et à l'état basal sans aucune activation, l'ATGL montre une préférence pour la position *sn*-2 des acylglycérols à chaînes longues, libérant ainsi le *sn*-1,3-DG (Eichmann *et al.*, 2012). Cette régiosélectivité de l'ATGL est inhabituelle parce que la plupart des lipases hydrolysent la liaison ester en position *sn*-1 et/ou *sn*-3, cette spécificité de l'ATGL peut indiquer une relation évolutive avec les PLA<sub>2</sub> de la famille de gènes nommée "*patatin-like phospholipase domain*" (PNPLA) comprenant un domaine patatin similaire à celui trouvé chez les acylhydrolases de plante. Les *sn*-1,3-DG ainsi libérés peuvent être ré-estérifiés par la DGAT, une enzyme du réticulum endoplasmique des adipocytes, pour reformer des TG. Suite à une stimulation hormonale et une activation par son cofacteur, l'ATGL modifie sa régiospécificité, et hydrolyse aussi les liaisons esters en position *sn*-1 des TG libérant ainsi les *sn*-1,3 et *sn*-2,3 DG (Eichmann *et al.*, 2012). Le fait que l'ATGL libère des *sn*-1,3-DG et *sn*-2,3-DG à partir des TG est une indication que cette enzyme ne serait pas impliquée dans l'activation des protéines kinases C (PKC) qui sont activées uniquement par le *sn*-1,2-DG (Eichmann *et al.*, 2012).

## 2. Protéines liées à la gouttelette lipidique du tissu adipeux :

### 2.1. Les Périlipines :

Les périlipines sont des protéines de structure associées aux LD et appartenant à la famille "PAT" en référence aux 3 premières protéines identifiées : la périlipine-1, l'adipophiline (*adipocyte differentiation related protein*, ADRP) ou périlipine-2, la TIP47 (*tail-interacting protein* de 47 kDa) ou périlipine-3 ; cette famille comporte aussi la périlipine-4 (S3-12) et la périlipine-5 (Dalen *et al.*, 2007; Ducharme and Bickel, 2008; Wolins *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2006). La périlipine-2 et la périlipine-3 sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que l'expression de la périlipine-1 et de la périlipine-4 est restreinte aux adipocytes (Greenberg *et al.*, 1991) et aux cellules stéroïdogéniques (Servetnick *et al.*, 1995). Les périlipines contiennent six sites potentiels de phosphorylation par la PKA dépendante de l'AMPc (Greenberg *et al.*, 1993; Londos *et al.*, 1999). Une autre étude a montré que le traitement des adipocytes humains avec les peptides natriurétiques provoquerait la phosphorylation des périlipines, indiquant que la protéine kinase G pourrait aussi intervenir dans la phosphorylation des périlipines (Sengenès *et al.*, 2003). En 2009, Granneman *et al.* (Granneman *et al.*, 2009a) ont montré que la phosphorylation par la PKA des résidus Ser492 et Ser517 de la périlipine-1 est responsable de sa liaison réversible avec la protéine CGI-58.

Il a été montré que les périlipines sont associées aux LD et à d'autres protéines régulatrices comme la protéine CGI-58 et la protéine G0S2 dans les adipocytes (Granneman *et al.*, 2007; Granneman *et al.*, 2009a; Greenberg *et al.*, 1991; Subramanian *et al.*, 2004). Les périlipines bloquent la lipolyse basale en s'organisant pour former une « barrière » qui empêche les enzymes lipolytiques d'accéder à leur substrat (Brasaemle *et al.*, 2000b). En réponse à une stimulation lipolytique, les périlipines sont phosphorylées et se dissocient de la surface des LD. Des expériences effectuées sur les pré-adipocytes 3T3-L1, dépourvus de périlipines, montrent que l'expression ectopique des périlipines-1 conduit à une augmentation significative du contenu lipidique. L'effet réciproque est aussi observé, l'accumulation des lipides conduit à l'augmentation du taux de périlipines endogènes (Brasaemle *et al.*, 1997; Brasaemle *et al.*, 2000a; Brasaemle *et al.*, 2000b; Brasaemle *et al.*, 2009).

L'utilisation de souris invalidées pour le gène des périlipines (*Plin*<sup>-/-</sup>) a permis de confirmer le rôle important de ces protéines dans la régulation de la lipolyse (Martinez-Botas *et al.*, 2000; Tansey *et al.*, 2001). En effet, Martinez *et al.* (Martinez-Botas *et al.*, 2000) ont montré que la masse du tissu adipeux chez les souris *Plin*<sup>-/-</sup> est très nettement inférieure à celle des souris témoins, avec une augmentation de la masse musculaire associée à une élévation du niveau métabolique. La lipolyse *in vitro* est augmentée en l'absence de toute stimulation, le niveau de la lipolyse basale atteint celui de la lipolyse maximale stimulée : l'ajout d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique n'augmente pas la libération de glycérol. Ces mêmes auteurs sont arrivés à corriger l'obésité des souris *db/db* (souris qui présentent un défaut dans le gène *db* codant le récepteur de la leptine) en les croisant avec des souris *Plin*<sup>-/-</sup>. Ces auteurs ont conclu que les périlipines sont des inhibiteurs de la lipolyse à l'état basal.

## **2.2. G0/G1 Switch protein 2 (G0S2) :**

Récemment, G0S2, un inhibiteur protéique spécifique de l'ATGL, a été identifié (Lu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010b). Cette protéine a été initialement trouvée dans les cellules mononucléaires du sang pendant le passage de la phase G0 à la phase G1 de la mitose (Russell and Forsdyke, 1991), cependant son rôle dans la division cellulaire reste peu clair. Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2010b) ont montré que la protéine G0S2 est bien exprimée dans le tissu adipeux et le foie, et que sa surexpression provoque une accumulation massive de lipides, ce qui indique un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique et énergétique.

Le gène humain codant la protéine G0S2 est localisé sur le chromosome 1q32.2 et comprend 2 exons. Le premier exon est non codant alors que le deuxième code la totalité de la protéine, l'ARNm correspondant est de 978 nucléotides. Les deux protéines G0S2 humaine et murine font 103 acides aminés avec 77 % d'identité de séquence. Il semble que la protéine G0S2 soit unique dans le sens où on ne trouve pas d'homologue dans les organismes plus éloignés dans l'évolution, comme *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*. De plus, G0S2 n'a d'homologie de séquence avec aucune protéine de structure 3D connue. Un domaine hydrophobe a été identifié, localisé entre les acides aminés 27 et 42, la délétion de cette région abolit l'interaction de la protéine G0S2 avec l'ATGL, de plus l'ATGL sans son domaine *patatin* n'interagit plus avec la protéine G0S2 (Yang *et al.*, 2010b).

Dans les adipocytes, l'expression de la protéine G0S2 est induite par l'insuline et inhibée par le TNF- $\alpha$  ou l'isoprotérénol ; ces deux facteurs stimulent la lipolyse (Yang *et al.*, 2010b). Zandbergen *et al.* (Zandbergen *et al.*, 2005) ont montré que l'ARNm codant la protéine G0S2 contient un domaine cible de la protéine PPAR $\gamma$  (PPRE) dans sa séquence promotrice. Ils ont montré aussi que l'expression de la protéine G0S2 est activée ou inhibée par les protéines PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  respectivement.

## **2.3. La protéine CGI-58 :**

### **2.3.1. Historique :**

Jusqu'à une date récente, il y avait seulement deux lipases possédant des cofacteurs : la lipase pancréatique et la lipoprotéine lipase (LPL) ayant respectivement comme cofacteur la colipase et l'apolipoprotéine C (Larsson and Erlanson-Albertsson, 1991; Wang *et al.*, 1985).

Il y a une dizaine d'années, Lass *et al.* (Lass *et al.*, 2006) ont montré que l'activité lipolytique de l'ATGL peut être augmentée d'environ 20 fois en présence de protéine CGI-58 appelée encore ABHD5 ( $\alpha/\beta$ -hydrolase domain 5). Cette protéine CGI-58 est exprimée dans le tissu adipeux, les testicules et les même tissus qui expriment la périlipine (Lass *et al.*, 2006).

Le gène *ABDH5/CGI-58* codant la protéine CGI-58 a été identifié pour la première fois à partir d'une approche d'identification de gènes comparables, où le protéome humain et celui de *Caenorhabditis elegans* ont été alignés pour détecter des gènes humains non encore



identifiés (Lai *et al.*, 2000). En 2001, Lefèvre *et al.* (Lefevre *et al.*, 2001) ont montré que la mutation du gène codant la protéine CGI-58 est à l'origine du CDS.

Lass *et al.* (Lass *et al.*, 2006) ont démontré que la protéine CGI-58 stimule la lipolyse *in vitro* et que c'est un activateur de l'ATGL qui n'a aucun effet sur la HSL. Quand la protéine CGI-58 est ajoutée à un extrait cytosolique du tissu adipeux murin, elle stimule la lipolyse.

La séquence d'acides aminés de la protéine CGI-58 est hautement conservée chez les vertébrés ; la protéine humaine a 94 % d'homologie de séquence avec son orthologue murin. La protéine CGI-58 est exprimée principalement dans les adipocytes matures et les testicules, et à des quantités plus faibles dans le foie, les muscles cardiaques et squelettiques, la peau, le foie, les neurones et le cerveau (Akiyama *et al.*, 2008; Lass *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2004). La protéine CGI-58 humaine a aussi été décrite comme un homologue de la protéine ICT1 (*Increased Copper Tolerance 1*) (Ghosh *et al.*, 2008b), une protéine trouvée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et impliquée dans la tolérance au cuivre (Entian *et al.*, 1999) et à l'isooctane (Matsui *et al.*, 2006). D'autres orthologues de la protéine CGI-58 ont été identifiés dans différentes espèces, comme chez les plantes, par exemple chez *Arabidopsis thaliana* le gène CGI-58 a pour code *At4g24160* (Ghosh *et al.*, 2009) (cf. IV.3), et d'autres espèces comme par exemple les oiseaux (Serr *et al.*, 2011) et les nématodes (Xie and Roy, 2015).

### **2.3.2. Localisation :**

Dans les cellules adipocytaires 3T3-L1, la protéine CGI-58 est localisée sur les LD, et est en interaction directe avec les périlipines-1 (Subramanian *et al.*, 2004). Cependant, quand les cellules sont traitées par des agents qui induisent ou activent la lipolyse, la protéine CGI-58 se trouve dispersée autour des LD.

### **2.3.3. Données structurales :**

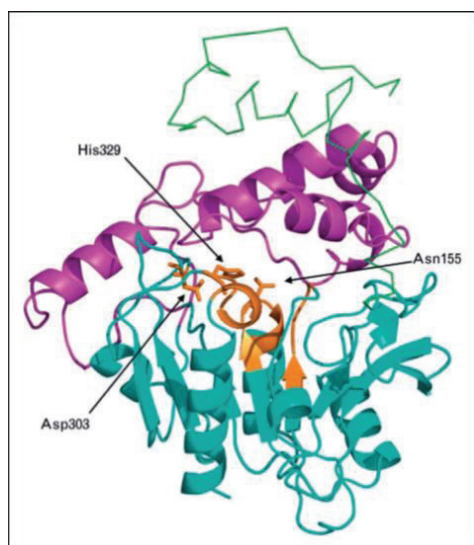
Le gène *ABDH5/CGI-58* humain code 7 exons et occupe une région de 31,8 kb sur le chromosome 3p21. La traduction de l'ARNm d'une taille de 5,37 kb produit une protéine de 349 acides aminés de masse approximative de 45 kDa. Chez les souris, deux ARNm de taille approximative de 1,4 et 3,2 kb codent la totalité de la protéine d'une taille de 351 résidus (Lass *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2004). Il existe encore un autre variant d'épissage, produisant une nouvelle isoforme de la protéine CGI-58 murine, constituée de 202 résidus (Yang *et al.*, 2010a).

La protéine CGI-58 appartient à la famille des estérases/thioestérases acyltransférases/lipases qui sont définies structuralement par la présence d'un repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase (Carr and Ollis, 2009) et un site actif qui comprend une triade catalytique trouvée chez les hydrolases des esters lipidiques (Zhang *et al.*, 1998). Cette triade catalytique consiste en un résidu sérine dans le motif de séquence GX SXG, un acide aspartique et une histidine (Oberer *et al.*, 2011). Cependant, dans la protéine CGI-58 humaine (ainsi que chez les autres Mammifères), la sérine catalytique putative est remplacée par une asparagine (Lefevre *et al.*,

2001). A cause de cette substitution d'acide aminé, la protéine CGI-58 humaine ne possède probablement pas d'activité lipase/estérase (Lass *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2007).

Un motif structural His-X<sub>4</sub>-Asp important pour une activité acyltransférase (Heath and Rock, 1998) se trouve du côté C-terminal des protéines CGI-58. Cependant la contribution de ce motif à une activité acyltransférase reste un sujet et un débat très controversé. Il faut noter que le résidu conservé His329 du motif HX<sub>4</sub>D est identique avec le résidu His supposé de la triade catalytique (**Figure 17**) et son implication dans une activité lipolytique n'avait pas encore été étudié.

Vu l'absence de structure 3D pour la protéine CGI-58, des modèles basés sur l'homologie avec les noyaux  $\alpha/\beta$  hydrolase ont été générés ; ces modèles ont fourni des informations intéressantes sur les caractéristiques de la protéine CGI-58 (Arnold *et al.*, 2009; Gruber *et al.*, 2010; Kiefer *et al.*, 2009). Un modèle de la protéine CGI-58 murine a été déduit de la structure de l'époxyde hydrolase soluble d'*Aspergillus niger* (17 % d'identité et 36 % de similarité) contenant un repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase (Gruber *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2000) (**Figure 17**). Le modèle généré, de l'Ala5 jusqu'à la Val350, comprend une région N-terminale (Ala5 – Val48) contenant des hélices  $\alpha$  et plusieurs boucles et un domaine contenant le repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase. Un volet (Pro180 – Leu280) inséré après le sixième brin  $\beta$ , couvre le site catalytique potentiel (Gruber *et al.*, 2010). En général, le site catalytique ou la triade catalytique est formé d'un résidu nucléophile (Ser/Asp), d'une histidine, et d'un Asp ou un Glu. Le résidu nucléophile est localisé dans le coude catalytique dans une séquence consensus G-X-S/D-X-G. Les résidus potentiels de la triade catalytique comportent l'Asn155, l'His329, et l'Asp303. Pour la protéine CGI-58 murine, c'est l'Asn155 qui se trouve dans la séquence consensus du coude catalytique, vu les propriétés chimiques de ce résidu, il ne peut pas contribuer à une activité lipolytique contrairement à une Ser retrouvée généralement dans cette position. Dans le modèle 3D de la protéine CGI-58 murine, la Phe86 est considérée comme participant au trou oxyanionique (**cf. II.4.3**). Le site potentiel de liaison au substrat est localisé entre le volet et le domaine contenant le repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase (**Figure 17**). Par analogie à d'autres  $\alpha/\beta$  hydrolases, le volet pourrait jouer un rôle important dans la détermination de la forme et les propriétés chimiques du site de liaison du substrat.



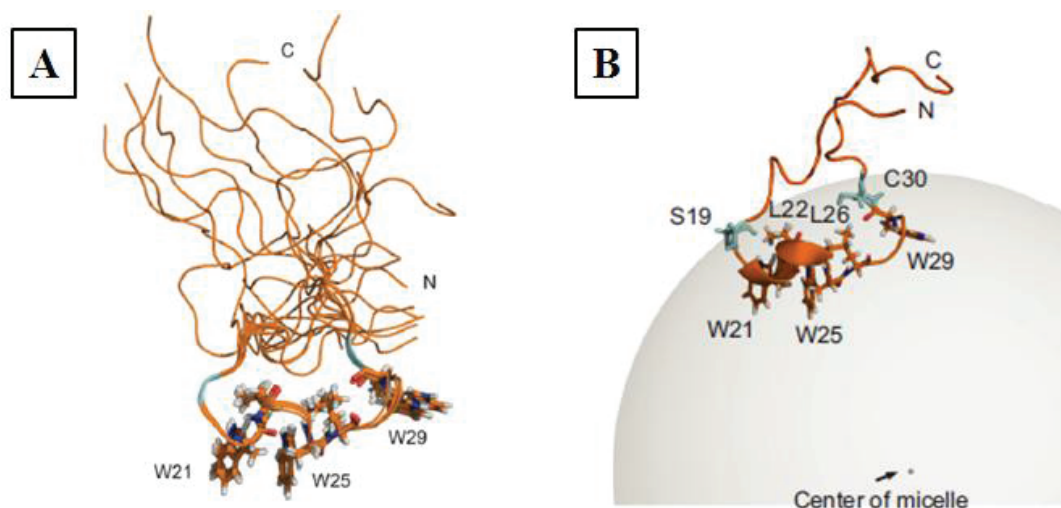
**Figure 17 :** Modèle 3D de la protéine CGI-58 murine. Le repliement  $\alpha/\beta$ -hydrolase et le volet sont représentés respectivement en bleu et violet. Les régions conservées contenant les séquences consensus G-X-S/N-X-G, HX<sub>4</sub>D, le résidu catalytique proposé Asp303 et la région conservée autour de l'acide aminé 86 formant le trou de l'oxyanion sont représentées en orange. L'extension N-terminale est présentée en vert. D'après (Oberer *et al.*, 2011).



Des mutations Q130P et E260K dans la protéine CGI-58 humaine ou bien la troncature de la région N-terminale abolissent la capacité de la protéine à activer l'ATGL ou à se lier aux LD (Granneman *et al.*, 2009a; Gruber *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010b). Ces mutations n'ont aucun effet sur l'activité acyltransférase de la protéine rapportée par Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2008a). Il a été montré que la région N-terminale riche en tryptophanes est impliquée dans ces deux fonctions. Cependant, la délétion de cette région n'abolit pas l'interaction de la protéine CGI-58 avec l'ATGL, il a donc été suggéré que la protéine CGI-58 interagirait directement avec la LD pour faciliter l'accès de l'ATGL à son substrat (Gruber *et al.*, 2010).

Récemment Boeszoermenyi *et al.* (Boeszoermenyi *et al.*, 2015) ont résolu un modèle de la structure de la partie N-terminale, riche en tryptophanes (de la Val10 à la Lys43) en liaison avec des micelles de dodecyl-PC. La structure résolue révèle que la région, de la Ser19 à la Cys30, constitue une ancre qui fixerait la protéine sur la LD. Dans ce modèle les Trp21 et Trp25 forment une poche hydrophobe avec deux résidus, Leu22 et Leu26, qui constituent la partie gauche de l'ancre, alors que le Trp29, isolé et entouré des deux prolines Pro27 et Pro31, constitue la partie droite de l'ancre (**Figure 18**).

Ils ont montré aussi (Boeszoermenyi *et al.*, 2015) qu'une protéine formée juste du peptide Val10-Lys43 peut lier la LD, et que cette partie peut agir comme un motif fonctionnel indépendant du reste de la protéine CGI-58. La mutation de l'un des deux Trp (soit le Trp21 soit le Trp29) n'abolit pas le pouvoir de la protéine CGI-58 à se fixer à la LD ou à activer l'ATGL, alors que la mutation concomitante des deux tryptophanes (Trp21 et Trp29) abolit ces deux capacités de la protéine CGI-58.



**Figure 18 :** Résolution de la structure du peptide V10-K43. **A :** superposition des 10 structures basées sur la minimisation de la déviation de la liaison entre les résidus Gly16 et Thr32. **B :** le peptide V10-K43 présenté en interaction avec la micelle. La Ser19 et la Cys30 délimitent l'interface entre la micelle et le solvant. Les trois tryptophanes (W21, W25 et W29) avec les deux leucines (L22 et L26) fixent le peptide dans la micelle. D'après (Boeszoermenyi *et al.*, 2015).

La mutation E262K dans la région du volet de la protéine CGI-58 murine abolit la capacité de la protéine à interagir avec les périlipines-1 et 2 (Granneman *et al.*, 2009a;

Granneman *et al.*, 2009b; Yamaguchi *et al.*, 2004), et il a été spéculé que ce volet joue un rôle important dans les interactions protéine-protéine. Cependant il n'est pas encore connu à ce jour si la protéine CGI-58 subit des changements conformationnels suite à son interaction avec ses partenaires protéiques.

Le volet pourrait jouer également un rôle dans la spécificité de substrat de la protéine CGI-58 dans chaque espèce ; on remarque que l'alignement (**Figure 19**) des séquences de toutes les espèces (animales, végétales, microorganismes) montre une homologie de 15 % alors que l'alignement dans une même famille comme les Mammifères (Homme, souris) ou les plantes (riz, *A. thaliana*) montre des identités de séquence de 94 et 85 % respectivement. Cela peut indiquer des fonctions biologiques différentes de la protéine CGI-58 chez les mammifères et les plantes.

```

At4g24160      MNLSRFASRLRMAEEISKTKVGSSSTASVADSSAAASAATNAAKSRWKILWPNSLRWIPT 60
CGI58          -----MAAEEEEVDSADTGERSGWLTGWLP--TWCPT 30
YLR099C        -----MWTNTFKWCSKTEKETTTADAKVCASVQGLKALQQQIMDSTTVRGSVN 48
                  : .      :.

At4g24160      STDYIIAAEKRLLSILKTPYVQEQVSIGSGPPGSKIRWFRSTSNESRYINTVTFDAKEGA 120
CGI58          SISHLKEAEEKMLKCVPTKKEPVRISSNGNKIWTLKFSHNISNKT----- 76
YLR099C        NTMTPGGINQWHFHNKRANKVCTPTVLIHGAYAASSMAFYRTFENLSDN-----IKDLY 101
                  .      :: :      . : *      . : : . * :

At4g24160      PTLVMVHGYGASQGGFFFRNFDALASR-FRVIADQLGWGGSSRP--DFTCRSTEETEAWF 177
CGI58          -PLVLLHGFGGGLGLWALNFGDLCTN-RPVYAFDLLGFRSSRP--RFDSDAEVENQF 131
YLR099C        AIDLPAANGASEAPALQVNKTKKIKSLRFKHIEDDVVIPVIEKRPPAEDIKSHLEQYESYF 161
                  : : * . . . :      : :      * :      . . **      * : * *

At4g24160      IDSFEWRKAQNLSNFILLGHSFGGYVAAKYALKHPEHVQHLILVGSAGFS----- 228
CGI58          VESIEEWRCALGLDKMILLGHNLGGFLLAAAYSLKYPSRVNHLILVEPWGFP----- 182
YLR099C        VDRIEQWRKDNKLRKINVVGHSGFYISFKYALKYPDSIEKLCLISPLGVENSIHAITHK 221
                  :: :*: **      * : : :*: :*: : : * :*: * . : * .

At4g24160      -AEADAKSEWLTKFRATWKGAVLNHLWESNFTTPQKLVRGLGFWGPGLVNRYTTARFGAHS 287
CGI58          -ERPDLADQ--DRPIPVWIRALGAALTP--FNPLAGLRAGPFGLSLVQRLRPDFKRKYS 237
YLR099C        WEPNTTYPLTFTDPSSRYYTRKLNVPRIFFENQLNLVWKWMPIGSKLCSNYISTAYVKVP 281
                  . :      .      : :      * * * * . . .

At4g24160      EGTGLTEEEAKLLTDYVYHTLAAKASGELCLKYIFSFGAFARKPLLQSASEWK--VPTTF 345
CGI58          S-----MFEDDTVTEYIYHCNVQTPSGETAFAKNMTIPYGWAKRPMLQRIQKMPDIPVSV 292
YLR099C        D---QIYKDYLLHSFVGKNQTVQPQTIKVFTHLFERNLIARDPIINNVRFLNPATPVMF 337
                  .      :      : : : . . .      : :      * : * : :      : * .

At4g24160      IYGMNDWMN-YQGAVEAR--KSMKVPCEIIRVPQGGHFVFIDNPIGFHSVAVLYACRKFI 402
CGI58          IFGARSCIDGNSGTSIQS--LRPHSYVKTIAILGAGHYVYADQPEEFNQVKVEICDTVD- 349
YLR099C        MYGEHDWMDKYAGYLTTESMLKNKAKASYVEVPDAGHNLFLDNPQHFASSLVSFSLSK--- 394
                  :*: . . : : *      :      . : : . ** : : * : * . :

At4g24160      QDSSHQQQLLDGLRLV 418
CGI58          -----
YLR099C        -----

```

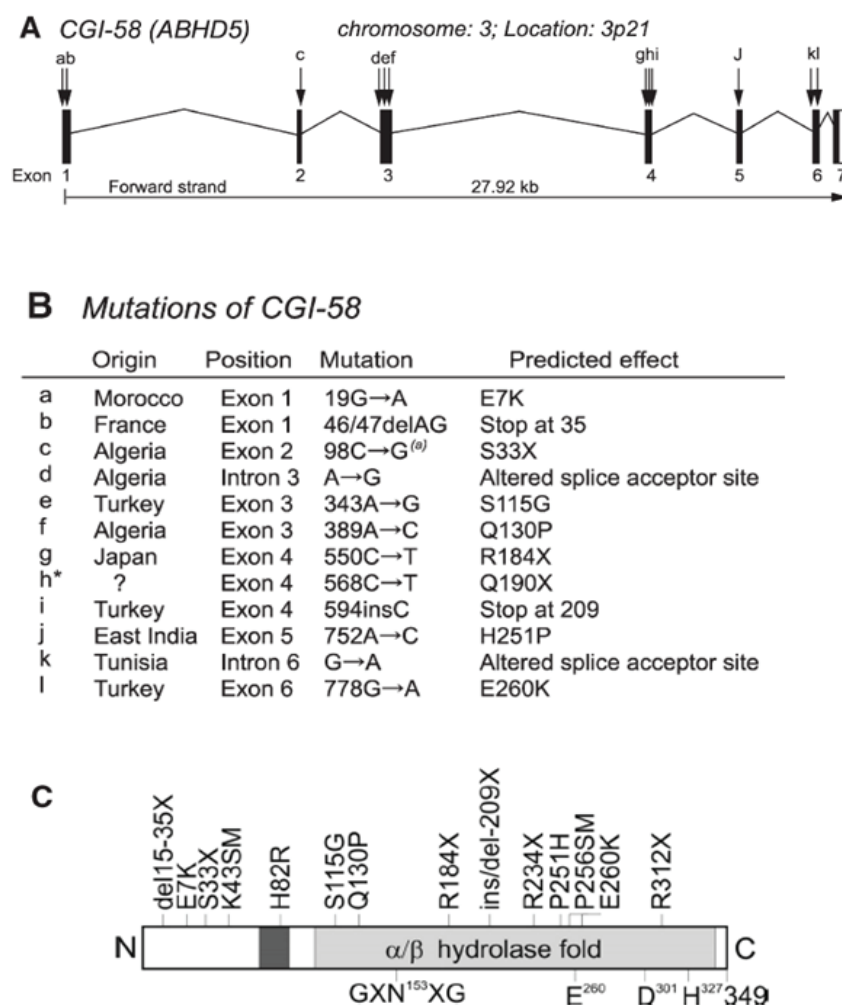
**Figure 19** : Alignement de séquence des acides aminés de la protéine CGI-58 issue de trois espèces différentes : plante *Arabidopsis thaliana* : **At4g24160** (NP\_974605.1) ; Homme : **CGI-58** (NP\_057090.2) ; levure *S. cerevisiae* : **YLR099C** (NP\_013200.1). D'après (Ghosh *et al.*, 2009).

### 2.3.4. Importance de la protéine CGI-58 :

La NLSDI ou CDS (OMIM 275630) est due à des mutations de la protéine CGI-58 (ABHD5) sans mutation de PNPLA2/ATGL (Fischer *et al.*, 2007a; Lefevre *et al.*, 2001). Cette maladie autosomique récessive très rare (à ce jour moins de 100 cas ont été rapportés au niveau mondial, dont la plupart se trouvent dans les pays méditerranéens) a été décrite la première fois par Chanarin *et al.* et Dorfman *et al.* (Chanarin *et al.*, 1975; Dorfman *et al.*, 1974). Au total, 33 mutations différentes de la protéine CGI-58 ont été rapportées comportant des délétions, des insertions, des mutations non-sens ou faux-sens, ou des variations du cadre de lecture (Missaglia *et al.*, 2014). Lefèvre *et al.* en 2001 (Lefevre *et al.*, 2001) ont fait l'analyse des mutations pour 9 patients de familles différentes, et ils ont trouvé huit mutations différentes : (a) quatre mutations point pour les acides aminés 7 (19G→A ; E7K), 33 (98G→C ; S33X), 130 (389A→C ; Q130P) et 260 (778G→A ; E260K); (b) une délétion de deux nucléotides (46/47delAG) et une insertion d'un seul nucléotide (594insC), provoquant, dans les deux cas, un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré à la position des acides aminés 35 et 209 respectivement ; (c) deux mutations au niveau du site d'épissage AG-accepteur dans les exons 3 (135-2A→G) et 6 (773-1G→A) qui aboutissent à un défaut d'épissage. Depuis l'étude de Lefèvre *et al.* en 2001, d'autres mutations ont été découvertes chez des patients NLSDI, comme une mutation non-sens dans l'exon 4 (R184X) aboutissant à une protéine tronquée de 48 % par rapport à la protéine normale (Akiyama *et al.*, 2003), d'autres mutations H251P (752A→C dans l'exon 5) (Srinivasan *et al.*, 2004), et S115G (343A→G dans l'exon 3) ont également été décrites (Ben Selma *et al.*, 2007) (**Figure 20**).

La NLSDI se caractérise par un stockage excessif de TG (de 2 à 20 fois plus) sous forme de vacuoles lipidiques dans toutes les cellules du corps comme les muscles, le cœur, le foie, les leucocytes et la peau. Un des phénotypes le plus évident et caractéristique chez un patient avec CDS est un défaut de perméabilité dans la barrière épidermique et une ichtyose, (non observable dans la NLSDM, provoquée par la mutation de l'ATGL), d'où son nom NLSDI ou NLSM avec ichtyose. D'autres symptômes peuvent apparaître comme la stéatose du foie, l'hépatomégalie, une myopathie cardiaque et squelettique, un retard de croissance, des cataractes et des pertes d'audition (Yamaguchi and Osumi, 2009).

La présence de l'ichtyose, et le problème de la perméabilité membranaire, dans le cas de NLSDI et pas dans celui de la NLSM, suggère un rôle supplémentaire de la protéine CGI-58 indépendant de son rôle comme cofacteur de l'ATGL. La déficience en protéine CGI-58 provoque une réduction des acylcéramides épidermiques chez les souris et l'Homme (Radner *et al.*, 2010; Uchida *et al.*, 2010), il faut noter que le défaut de la peau dans les souris NLSDI est beaucoup plus grave que chez l'Homme (Radner *et al.*, 2010), les souris CGI-58<sup>-/-</sup> meurent peu après leur naissance à cause d'une déshydratation résultant du problème de défaut de perméabilité.



**Figure 20 : A :** Représentation schématique de la structure du gène *ABHD5* codant la protéine CGI-58 avec les sites des mutations dans le cas de NLSDI ; **B :** Liste des différentes mutations de la protéine CGI-58 trouvées dans le cas de NLSDI ; **C :** Représentation des domaines de la protéine CGI-58 avec la position des différentes mutations. D'après (Schweiger *et al.*, 2009).

Il est connu que les acylcéramides sont des lipides essentiels pour la formation des enveloppes lipidiques des cornéocytes, leur absence dans les patients déficient en protéine CGI-58 est probablement la cause initiale des problèmes de défaut de perméabilité membranaire.

Récemment, des relations établies, entre le dysfonctionnement de la perméabilité membranaire et la déficience de l'activité des enzymes et activateurs lipolytiques, ont suggéré des rôles importants de ces activateurs dans le maintien du mécanisme métabolique des lipides et dans la perméabilité de la membrane.

#### 2.3.4.1. La protéine CGI-58 et la peau :

La fonction principale de la peau consiste à former une barrière entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur du corps (Feingold, 2007; Proksch *et al.*, 2008). Dans ce sens, la peau protège l'individu des influences environnementales comme les impacts mécaniques, les rayons ultraviolets, les substances chimiques et les microorganismes pathogènes.

Toutefois, pour la survie sur Terre, dans cet environnement sec, la peau fonctionne aussi comme une barrière agissant contre la perte d'eau et d'électrolytes, et en minimisant la déshydratation (Jensen and Proksch, 2009; Madison, 2003). Cette perméabilité membranaire est régulée par la couche la plus externe de la peau constituée des cornéocytes. Ces cellules sont imbibées dans une matrice extracellulaire enrichie de lipides composés de céramides, de cholestérol et d'AGNE (Feingold, 2009; Wertz, 1992).

La présence d'ichthyose, ou d'autres anomalies de la peau, est retrouvée chez les patients avec des mutations de la protéine CGI-58, mais pas chez les patients avec des mutations dans la protéine ATGL (Fischer *et al.*, 2007a; Haemmerle *et al.*, 2006; Radner *et al.*, 2010), ce qui suggère que l'ATGL ne joue pas un rôle essentiel dans le métabolisme lipidique épidermique, et que la protéine CGI-58 a elle un rôle indépendant de l'ATGL dans ce tissu (Radner *et al.*, 2010; Uchida *et al.*, 2010).

L'examen microscopique de la peau des patients avec NLSDI révèle un grand nombre de petites LD dans l'épiderme (Akiyama *et al.*, 2003; Ben Selma *et al.*, 2007). Demerjian *et al.* (Demerjian *et al.*, 2006) ont montré que la disposition anormale des vésicules lipidiques dans les couches épidermiques forme des phases séparatives de nature hydrophobique, ce qui augmente la déficience de la perméabilité des membranes.

Pour étudier la composition lipidique de l'épiderme dans le cas de la NLSDI, et dans le but de comprendre le rôle de la protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique de la peau, des souris déficientes en protéine CGI-58 (CGI-58<sup>-/-</sup>) ont été utilisées. Il a été montré que l'épiderme de ces souris accumule de grandes quantités de TG suite à une diminution de leur hydrolyse, à la différence des souris déficientes en ATGL qui ne présentent aucun changement dans le métabolisme lipidique épidermique. Cependant, l'ajout de protéine CGI-58 purifiée chez ces souris CGI-58<sup>-/-</sup> restaure partiellement cette activité TG hydrolase. Vus ensemble, ces résultats supportent l'hypothèse que la protéine CGI-58 active une TG-lipase, autre que l'ATGL, et qui serait responsable de la libération des acides gras pour l'estérification des  $\omega$ -OH-céramides en acylcéramides (Radner *et al.*, 2010). Ces derniers forment les lipides épidermiques majeurs du *stratum corneum* et sont des précurseurs essentiels pour la formation de l'enveloppe lipidique des cornéocytes.

En raison de la déficience en synthèse et en catabolisme des TG dans l'épiderme, les souris CGI-58<sup>-/-</sup> montrent une diminution de la synthèse des acylcéramides ainsi qu'une diminution de la quantité de protéines de structure (involucrine, envoplakine et périplakine) des cornéocytes liées au  $\omega$ -OH-céramides (Radner *et al.*, 2010). Les acylcéramides sont formés à partir des céramides par la liaison des acides gras à chaîne longue via une liaison amide, par une  $\omega$ -hydroxylation de ces acides gras, et finalement par leur  $\omega$ -(O)-estérification par l'acide linoléique. Les acylcéramides forment une structure épidermique constituant une interface entre deux couches, hydrophile et hydrophobe, qui est primordiale pour un bon fonctionnement de la perméabilité membranaire du *stratum corneum* (Sandhoff, 2010; Uchida and Holleran, 2008). Wertz et Downing ont montré que la majorité des acides gras (acide linoléique) des acylcéramides sont issus de l'hydrolyse des TG et des phospholipides (Wertz and Downing, 1990). Il semble que chez les souris CGI-58<sup>-/-</sup> ce transfert n'ait pas lieu, ce qui



aboutit à un profil lipidique perturbé et donc une déficience de la perméabilité membranaire. Ces autres données suggèrent une nouvelle fois une relation directe ou indirecte de la protéine CGI-58 avec une lipase, autre que l'ATGL, et spécifique de l'hydrolyse des TG épidermiques pour la synthèse des acylcéramides.

#### **2.3.4.2. La protéine CGI-58 dans le tissu adipeux :**

Si la protéine CGI-58 ne fonctionnait que comme activateur de l'ATGL dans le tissu adipeux blanc, alors le phénotype des mutants CGI-58 devrait être similaire à celui de la déficience en ATGL. Mais ce n'est pas vraiment le cas : dans le tissu adipeux blanc des souris CGI-58<sup>-/-</sup> on observe une diminution de 50 % de la masse totale de graisse, et une protection contre l'obésité induite par un régime enrichi en graisses (Brown *et al.*, 2010).

De plus, lors de la stimulation de la lipolyse dans les adipocytes, la majorité de la protéine CGI-58 se disperse des LD vers le cytoplasme, et seulement une petite quantité reste liée aux LD, pour l'activation de l'ATGL (Granneman *et al.*, 2007; Miyoshi *et al.*, 2007). Ces faits suggèrent un rôle physiologique de la protéine CGI-58 dans le tissu adipeux blanc indépendant de l'activation de l'ATGL. Il se peut que la protéine CGI-58 favorise l'expansion du tissu adipeux blanc par un mécanisme indépendant de l'ATGL, en intervenant dans le mécanisme de synthèse des glycérophospholipides ou des signaux lipidiques dans les adipocytes.

#### **2.3.4.3. La protéine CGI-58 dans le foie :**

Chez les patients humains atteints de NLSD, l'hépatomégalie et la stéatose hépatique sont plus communs avec la mutation de la protéine CGI-58 qu'avec la mutation de l'ATGL (Schweiger *et al.*, 2009). La déficience en protéine CGI-58 provoque une augmentation des niveaux des TG hépatiques, environ 4 fois plus grands que chez les contrôles (Brown *et al.*, 2010; Lord *et al.*, 2012; Radner *et al.*, 2010), avec une diminution des niveaux des AGNE intracellulaires. Chez les souris CGI-58<sup>-/-</sup>, il y a une diminution de 73 % de l'activité TG hydrolase dans le foie en comparaison avec les souris sauvages, alors que chez les souris ATGL<sup>-/-</sup> il n'y a que 46 % de diminution de cette activité (Radner *et al.*, 2010). De plus, chez les souris CGI-58<sup>-/-</sup>, on observe une diminution des niveaux d'oxydation dans le foie et une diminution des quantités des VLDL sécrétées (Brown *et al.*, 2007; Caviglia *et al.*, 2009). Une autre observation chez les souris CGI-58<sup>-/-</sup> est l'accumulation des DG et des céramides dans le foie (Hoy *et al.*, 2011; Turpin *et al.*, 2011). Toutes ces observations suggèrent également un rôle supplémentaire de la protéine CGI-58 dans le foie, autre que son rôle d'activation de l'ATGL.

Cependant, le phénotype le plus apparent qui propose un autre rôle indépendant de la protéine CGI-58 dans le foie est la différence dans la signalisation hépatique par l'insuline.

#### **2.3.4.4. La protéine CGI-58 et la sensibilité à l'insuline :**

Malgré l'accumulation hépatique des TG, DG et céramides, la déficience en protéine CGI-58 améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Brown *et al.*, 2010). En fait, l'inactivation du gène *CGI-58* protège complètement les souris contre l'hyperglycémie,



l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline. Il faut noter que les souris ATGL<sup>-/-</sup> ont le même phénotype vis-à-vis la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, mais les mécanismes sous-jacents sont significativement différents.

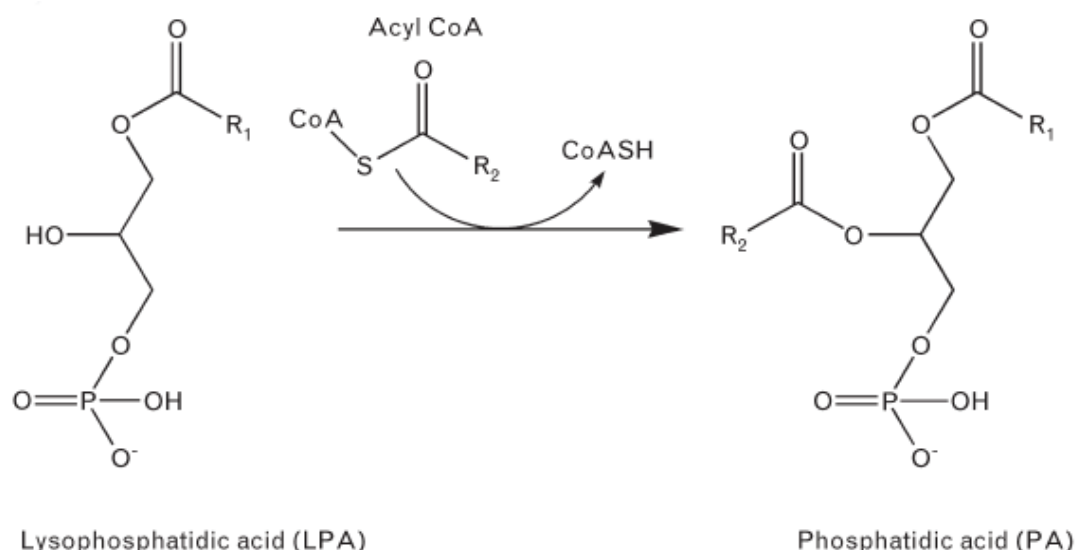
La déficience ou la surexpression de l'ATGL dans le foie ne change pas la réponse à l'inflammation hépatique chez les souris à régime enrichi en graisse (Turpin *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011), alors que l'invalidation de la protéine CGI-58 dans le foie abolit la phosphorylation des IκBα, JNK et S6, suite à la réponse des cytokines inflammatoires comme le TNFα, IL-1β et IL-6 (Lord *et al.*, 2012). De plus, l'invalidation de la protéine CGI-58 dans le foie est associée à l'inhibition de l'activation des kinases liées au stress (IKK, mTOR, S6K1, et JNK) et induites par le régime enrichi en graisse, et à l'inhibition de la phosphorylation des résidus sérines (Ser101) des récepteurs d'insuline (IRS1) (Lord *et al.*, 2012).

Il est bien connu que l'acide phosphatidique, issu de l'activité de la phospholipase D sur les phospholipides membranaires, active mTORC1, qui par la suite active les S6 kinases 1 (S6K1) (Fang *et al.*, 2001; Hornberger *et al.*, 2006; Sun and Chen, 2008; Sun *et al.*, 2008), ce qui induit la phosphorylation des récepteurs IRS-1 et l'inhibition de la réponse à l'insuline (Tremblay *et al.*, 2007). Puisque l'invalidation de la protéine CGI-58 empêche la phosphorylation des sérines des IRS-1 dans le foie, il est possible que la protéine CGI-58 intervienne dans le mécanisme de synthèse des signaux lipidiques comme l'acide phosphatidique. D'autres études ont relié la protéine CGI-58 avec l'inactivation du complexe mTORC-2, puisque ce dernier est inhibé par l'acide phosphatidique et qu'il est responsable de la phosphorylation des protéines Akt dans les hépatocytes (Zhang *et al.*, 2012).

### **2.3.5. Rôle et activité enzymatique de la protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique :**

La protéine CGI-58 a été identifiée comme activateur de la lipolyse en stimulant l'ATGL (Lass *et al.*, 2006). Le mécanisme de la régulation de la lipolyse exige une interaction de la protéine CGI-58 avec l'ATGL et plusieurs membres de la famille des périlipines, comme la périlipine-1, 2 et 5 (**cf. III.3.2**).

En plus de son rôle putatif de régulation d'enzymes autres que l'ATGL, il a été proposé que la protéine CGI-58 possède une activité enzymatique propre. Il a été rapporté pour la première fois en 2009 que la protéine CGI-58 de plante (*A. thaliana*), exprimée dans *E. coli*, puis purifiée, possède plusieurs activités enzymatiques : une activité majeure LPAAT (Lysophosphatidic acid acyl-CoA acyltransferase) (**Figure 21**) où la protéine CGI-58 catalyse le transfert d'un groupement acyle d'un acyl-Coenzyme A (acyl-CoA) vers l'acide lysophosphatidique (LPA) pour former un acide phosphatidique (Ghosh *et al.*, 2009), et deux autres activités hydrolases vis-à-vis des TG et des PC qui sont environ 12000 fois moins importantes que l'activité LPAAT (Ghosh *et al.*, 2009). Cependant, ces deux activités n'ont été jamais reliées à des fonctions physiologiques (**cf. IV.3.1**).



**Figure 21 :** Réaction catalysée par l'acide lysophosphatidique acyl-CoA acyltransférase ou LPAAT.

En 2010, une autre étude indépendante a montré une activité LPAAT pour la protéine CGI-58 murine, exprimée dans *E. coli* et purifiée (Montero-Moran *et al.*, 2010). Aucune activité hydrolase vis-à-vis des TG et PC n'a été rapportée pour cette protéine CGI-58 murine. Dans cette étude, la protéine CGI-58 murine étiquetée avec une séquence 12xHis du côté N-terminal avait été exprimée dans *E. coli*, en utilisant le plasmide pET28a(+) et la souche BL21(DE3). La protéine recombinante a été par la suite purifiée à partir de la fraction soluble dans des conditions natives en utilisant une chromatographie d'affinité sur colonne de nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-agarose). L'activité LPAAT de la protéine recombinante a été testée, en utilisant des substrats radiomarqués. Plusieurs accepteurs de la chaîne acyle, comme le lyso-PA, la lyso-PC, le lyso-PI, la lyso-PS, la lyso-PE, le glycérol-3P, la sphingosine, la sphinganine et la phytosphingosine, ont été utilisés en présence d'oléoyl-CoA. L'activité acyltransférase de la protéine CGI-58 murine n'a été détectée qu'en présence de lyso-PA avec une activité spécifique de l'ordre de 6 nmol de PA formé / min / mg d'enzyme (Montero-Moran *et al.*, 2010). La protéine CGI-58 murine recombinante a montré une légère préférence pour le 1-oléoyl-LPA comme substrat par rapport à d'autres accepteurs comme le 1-palmitoyl-LPA, le 1-stéaroyl-LPA, ou le 1-arachidonoyl-LPA. La protéine recombinante a montré également une préférence pour l'arachidonoyl-CoA et l'oléoyl-CoA comme donneur du groupement acyle (Montero-Moran *et al.*, 2010).

Plusieurs hypothèses ont été alors formulées pour expliquer la différence de phénotypes entre les patients déficitaires en ATGL ou en CGI-58, en se basant sur le fait que la protéine CGI-58 contrôle le niveau de PA directement par son activité LPAAT. Mais la donnée la plus contradictoire, et non explicable, est le fait que les patients et les souris déficitaires en protéine CGI-58 avaient des niveaux de PA comparables aux contrôles sauvages (Brown *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2008a; James *et al.*, 2010).

En 2014, une autre équipe (Zhang *et al.*, 2014) a montré une activité LPGAT (lysophosphatidylglycérol acyl-CoA acyltransférase) pour la protéine CGI-58 humaine exprimée dans des cellules de mammifère. En effet, les auteurs ont montré, en utilisant des

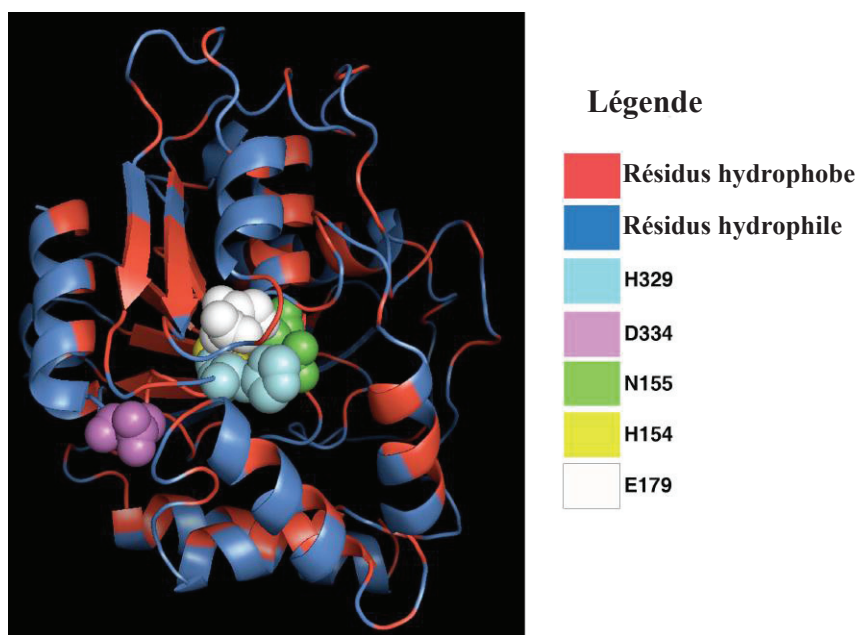
tests *in vivo* (par la surexpression et/ou l'invalidation de la protéine CGI-58 humaine dans les cellules 293T et les cellules C2C12) et *in vitro* (en utilisant la protéine recombinante étiquetée avec une étiquette FLAG et purifiée à partir de cellules d'insectes Sf9 en utilisant une résine d'anticorps anti-FLAG), que la protéine CGI-58 humaine possède dans les conditions testées, une activité acyltransférase, synthétisant du PG à partir d'un lyso-PG spécifiquement, mais pas en présence d'autres accepteurs comme le lyso-PC, la lyso-PE, le lyso-PI, la lyso-PS ou la monolysocardiolipine. Par ailleurs, la protéine recombinante a montré une préférence pour l'oléoyl-CoA comme donneur de chaîne acyle avec une activité spécifique de l'ordre de 5 nmol de PG formé / min / mg d'enzyme.

La surexpression ou l'invalidation de la protéine CGI-58 humaine dans les cellules C2C12 (cellules métaboliquement actives de muscle squelettique de souris) induit, respectivement, une augmentation ou une diminution, du niveau de PG endogène (Zhang *et al.*, 2014). Le PG est un précurseur pour la synthèse de la cardiolipine, un phospholipide nécessaire pour la phosphorylation oxydative dans les mitochondries et la mitophagie mitochondriale (Dowhan, 1997). La surexpression et l'invalidation de la protéine CGI-58 affecte en conséquence l'autophagie et la mitophagie dans les cellules C2C12 (Zhang *et al.*, 2014). En effet, la surexpression de la protéine CGI-58 stimule la fission des mitochondries et la translocation de PINK1 (une kinase mitochondriale nécessaire pour l'initiation de la mitophagie) vers les mitochondries ; ces deux étapes sont nécessaires pour la mitophagie. La surexpression de la protéine CGI-58 humaine dans les cellules COS-7 ou C2C12 déclenche la fission des mitochondries en augmentant le niveau d'expression de la protéine de fission DRP1, une protéine appartenant à la famille des dynamin-1-like protéines, qui hydrolysent le GTP, événement nécessaire au déclenchement de la fragmentation des mitochondries. En revanche, les niveaux d'expression de la protéine OPA1 (optic atrophy 1) et la mitofusine 2 (MFN2), deux autres protéines impliquées dans la fragmentation mitochondriale, ne sont pas affectés par la surexpression de la protéine CGI-58 humaine dans les cellules C2C12 (Zhang *et al.*, 2014).

Par ailleurs, Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2014) ont établi une relation entre la surexpression de la protéine CGI-58 humaine et l'augmentation de l'autophagie dans les cellules C2C12, en montrant une diminution de l'expression des protéines p62 et NRF2, et une augmentation du rapport LC3II/LC3-I, biomarqueurs de l'autophagie (Tanida and Waguri, 2010). De même, la surexpression de la protéine CGI-58 humaine stimule l'activité de l'AMPK (protéine kinase activée par l'AMP, activateur de l'autophagie) et inhibe le signal mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1, inhibiteur de l'autophagie), en conditions basales, tandis que l'invalidation du gène codant la protéine CGI-58 humaine provoque l'effet opposé (Zhang *et al.*, 2014).

Les résidus His329 et Asp334 au sein de la séquence consensus HX<sub>4</sub>D de la protéine CGI-58 murine ont été suggérés comme étant potentiellement responsables de l'activité LPAAT. Dans le but de caractériser ces résidus catalytiques, McMahon *et al.*, (McMahon *et al.*, 2014) ont généré un modèle 3D de la protéine murine en utilisant le programme PHYRE (Kelley and Sternberg, 2009) (**Figure 22**). En utilisant ce modèle, l'His329 est localisée dans une poche hydrophobe à l'intérieur de la protéine alors que l'Asp334 se trouve à la surface de

la protéine à une distance de 12,5 Å de l'His329. Il faut mentionner que dans les acyltransférases déjà décrites, cette distance a été déterminée comme étant de l'ordre de 2,5 à 4 Å (Golczak *et al.*, 2012). Ainsi, sur la base de ce modèle théorique, il semblait peu probable que l'His329 et l'Asp334 soient positionnés de façon optimale pour être des résidus du site catalytique. Pour tester cette hypothèse, McMahon *et al.* (McMahon *et al.*, 2014) ont remplacé ces deux acides aminés, par mutagenèse dirigée, par un résidu alanine, en utilisant le plasmide recombinant pET28a-12xHis /CGI-58 murine (Montero-Moran *et al.*, 2010). En testant l'activité LPAAT de ces mutants contre l'activité de la protéine CGI-58 sauvage, en les purifiant à partir de la souche BL21(DE3) par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt, il s'est avéré que l'activité LPAAT des mutants était identique à celle de la protéine sauvage (McMahon *et al.*, 2014). L'activité LPAAT attribuée à la protéine CGI-58 pourrait être donc due à un contaminant purifié en même temps que la protéine CGI-58 recombinante et qui pourrait être la protéine bactérienne plsC, la seule protéine responsable d'une activité LPAAT chez *E. coli*. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont purifié la protéine CGI-58 recombinante, ainsi que la protéine plsC, à partir d'une souche d'*E. coli* déficiente en plsC, la souche SM2-1. En testant donc l'activité LPAAT de ces deux protéines recombinantes contre un contrôle négatif, il s'est avéré que la protéine CGI-58 recombinante de souris purifiée dans ces conditions ne possède aucune activité acyltransférase, et que l'activité LPAAT rapportée pour la protéine CGI-58 exprimée dans *E. coli* était bien due à la protéine plsC (McMahon *et al.*, 2014).



**Figure 22 :** Modèle 3D théorique de la protéine CGI-58 murine, d'après (McMahon *et al.*, 2014). H329 et D334 : résidus putatifs de l'activité LPAAT. H329 est localisée dans une poche à l'intérieur de la protéine alors que D334 se trouve à la surface extérieure de la protéine à une distance de 12,5 angströms de H329.

Pour valider cette hypothèse, McMahon *et al.* (McMahon *et al.*, 2014) ont testé l'activité de la protéine CGI-58 humaine recombinante exprimée dans la levure, vu que plusieurs travaux (Ghosh *et al.*, 2008a; Zhang *et al.*, 2014) avaient rapporté une activité

LPAAT de la protéine CGI-58 humaine recombinante. L'activité LPAAT de la protéine CGI-58 a été testée sur la protéine exprimée dans deux souches différentes de levure, la première étant une souche sauvage alors que la seconde était la souche *ict1Δ* (protéine responsable de l'activité LPAAT chez la levure). Dans ces conditions, aucune activité acyltransférase de la protéine CGI-58 humaine n'a été trouvée (McMahon *et al.*, 2014). Par ailleurs, la protéine CGI-58 recombinante a perdu la capacité de se lier au LPA alors qu'elle présente une forte affinité pour le PI-1-phosphate (PIP) et plus précisément ses deux isomères le PI(3)P et le PI(5)P (McMahon *et al.*, 2014). Il est connu que le PIP facilite la liaison de plusieurs protéines, impliquées dans la signalisation cellulaire, à la membrane (Bridges *et al.*, 2012; Mayinger, 2012). Il est donc possible que le PIP contrôle avec d'autres molécules, comme les périlipines, la localisation et la translocation de la protéine CGI-58 (McMahon *et al.*, 2014).

### 3. Régulation de la lipolyse :

#### 3.1. Contrôle hormonal de la lipolyse :

Il est bien établi depuis les années 1960 que des hormones comme l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et l'adrénaline, qui sont libérées au cours du jeûne, augmentent la lipolyse (Hollenberg *et al.*, 1961; Rizack, 1964) et que l'insuline inhibe cette activation (Froesch *et al.*, 1965; Goodridge and Ball, 1965; Rodbell and Jones, 1966). Il a été aussi montré que l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc) est impliquée dans la régulation exercée par les catécholamines sur l'activité lipolytique dans le tissu adipeux (Rizack, 1964). Aujourd'hui il est largement admis que la lipolyse adipocytaire est contrôlée par différents effecteurs lipolytiques et antilipolytiques, comme des hormones, des cytokines et des adipokines (Brasaemle, 2007; Holm *et al.*, 2000; Langin, 2006).

##### 3.1.1. Les catécholamines :

Des hormones, comme les catécholamines, sont capables de stimuler la lipolyse *via* la réceptivité adrénergique du tissu adipeux blanc (**Figure 23**) (Holm *et al.*, 2000; Lafontan and Berlan, 1993). Ces récepteurs sont soit des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR) couplés positivement à l'adénylate cyclase *via* les protéines Gs soit des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques ( $\alpha$ -AR) couplés négativement *via* les protéines Gi. L'activation de la lipolyse est contrôlée par l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMPc suite à l'activation des protéines Gs après liaison des catécholamines sur les récepteurs  $\beta$ -AR. L'AMPc augmente ainsi l'activité de la protéine kinase A (PKA) (Collins *et al.*, 2004; Holm, 2003; Holm *et al.*, 2000). La PKA est principalement responsable de la phosphorylation des enzymes lipolytiques comme la HSL et des protéines associés à la LD comme les périlipines qui par la suite régulent l'activité de l'ATGL et de la protéine CGI-58 (Wang *et al.*, 2011). Des travaux du laboratoire de Per Belfrage (Stralfors and Belfrage, 1983; Stralfors *et al.*, 1984) indiquent que la HSL adipocytaire est phosphorylée en 2 sites : un premier site, appelé site basal, qui est phosphorylé dans les conditions basales, et un deuxième site, appelé site régulateur, qui est phosphorylé par la PKA après une stimulation. Récemment la réévaluation de la phosphorylation des sites de la HSL humaine a montré que la Ser649 et Ser650 sont les déterminants majeurs de l'activation par la PKA (Krintel *et al.*, 2008). Les périlipines sont

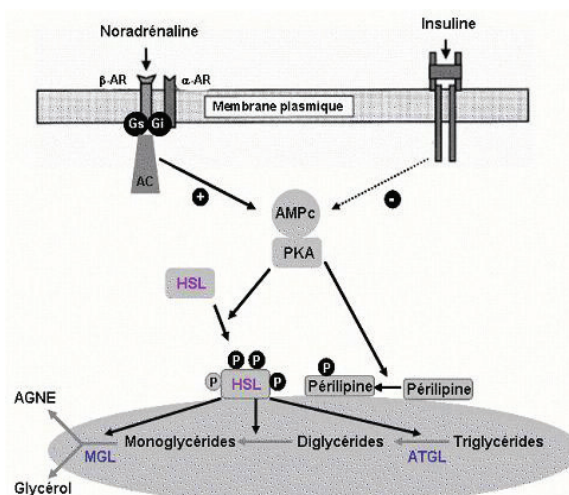


principalement associées aux LD (Greenberg *et al.*, 1991) et en cas d'une activation lipolytique des adipocytes, elles se trouvent rapidement phosphorylées et se dissocient de la surface des LD permettant l'accès de l'ATGL et de la HSL à leurs substrats (Brasaemle *et al.*, 2000a; Brasaemle *et al.*, 2000b). La phosphorylation de la HSL et des périlipines augmente considérablement le taux de lipolyse adipocytaire, près de 100 fois plus, ce qui conduit à l'hydrolyse des TG en AGNE et glycérol.

Il a été montré que l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux peut se faire grâce à différentes molécules antilipolytiques *via* les récepteurs couplés à la protéine Gi (Holm *et al.*, 2000). Parmi ces molécules, il y a les catécholamines qui agissent *via* les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergique (Lafontan and Berlan, 1993), l'adénosine (récepteur A1-adénosine) (Larrouy *et al.*, 1991), les prostaglandines (récepteur E2) (Richelsen, 1992), NPY (récepteur NPY-1) (Bradley *et al.*, 2005), et l'acide nicotinique (récepteur GPR109A) (Offermanns, 2006). La distribution des récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques détermine alors l'activité lipolytique dans les tissus ou les cellules.

### 3.1.2. L'insuline :

L'insuline est une hormone connue comme un inhibiteur physiologique de la lipolyse induite par les catécholamines (Degerman *et al.*, 1998; Eriksson *et al.*, 1995; Langin, 2006) (**Figure 23**). La liaison d'une molécule d'insuline sur son récepteur spécifique va entraîner son activation par phosphorylation et permet le recrutement à la membrane des substrats du récepteur de l'insuline (IRS, "*insulin receptor substrates*") IRS-1 et IRS-2 (Capeau, 2003). Après avoir été phosphorylées par le récepteur, ces protéines recrutent à leur tour la PI 3-kinase (PI3K) qui catalyse la phosphorylation des lipides membranaires. Cette phosphorylation induit l'activation d'une protéine kinase B (PKB/AKT) qui catalyse la phosphorylation des phosphodiesterases. Ces phosphodiesterases diminuent le niveau de l'AMPc, en l'hydrolysant en 5'AMP, ce qui entraîne une inactivation des PKA et par la suite une diminution de la phosphorylation des protéines associées à la LD et la réduction de l'activation de la cascade de la lipolyse par les catécholamines (Degerman *et al.*, 1998).



**Figure 23 :** Régulation de la lipolyse dans le tissu adipeux blanc par les catécholamines et l'insuline. (Holm *et al.*, 2000). AR: récepteur adrénergique, AC: adényl cyclase, Gs/Gi: protéine G stimulatrice/inhibitrice.



### 3.2. Régulation de l'ATGL :

#### 3.2.1. Par la protéine CGI-58 :

Il a été montré que l'activité de l'ATGL peut être augmentée de 20-fois par un activateur protéique (Lass *et al.*, 2006), la protéine CGI-58 ou ABDH5 (Yang *et al.*, 2010b) (Schweiger *et al.*, 2008) (Gruber *et al.*, 2010) (Granneman *et al.*, 2009a). Cette activation a été montrée *in vitro*, dans les tissus adipeux et dans les tissus non adipeux.

- ***In vitro :***

Les essais couramment utilisés pour tester l'hydrolyse des TG *in vitro* ont été employés pour tester l'activité lipolytique de l'ATGL. Dans ces tests, le substrat, le TG, est apporté dans un tampon aqueux avec l'enzyme, ATGL et/ou CGI-58, dans des extraits bruts (Zimmermann *et al.*, 2004) (Lass *et al.*, 2006) (Gruber *et al.*, 2010). Dans ces essais, la protéine CGI-58 stimule l'ATGL, ce qui montre la présence d'une interaction directe entre les deux protéines, et montre également que la protéine CGI-58 n'a pas besoin de la présence d'autres protéines se liant aux LD pour activer l'ATGL (Gruber *et al.*, 2010) (Lass *et al.*, 2006) (Zimmermann *et al.*, 2004) (Schweiger *et al.*, 2008) (Bezaire *et al.*, 2009a; Bezaire *et al.*, 2009b) (Alsted *et al.*, 2009). Ce mécanisme d'activation est toujours mal connu à ce jour.

- ***Dans le tissu adipeux :***

Dans les cellules non stimulées, la protéine CGI-58 est liée aux périlipines-1 non phosphorylées à la surface des LD. Au même moment, l'ATGL est localisée dans le cytosol et, pour une partie, sur la LD, alors que la HSL est cytosolique (Granneman and Moore, 2008) (Granneman *et al.*, 2007). Suite à une stimulation  $\beta$ -adrénergique, les PKA phosphorylent la HSL et la périlipine-1, ce qui provoque la translocation de l'HSL vers la LD et la dissociation de la protéine CGI-58 des périlipines-1 (Granneman and Moore, 2008) (Brasaemle *et al.*, 2009), pour interagir avec l'ATGL. L'interaction ATGL / CGI-58 a été montrée avoir lieu principalement avec la partie de l'ATGL qui se trouve sur la LD, et à des niveaux moindre avec la partie cytoplasmique (Granneman *et al.*, 2009a).

La lipolyse stimulée peut également impliquer la translocation de l'ATGL de la fraction cytoplasmique et de la fraction liée au réticulum endoplasmique vers la LD (Yang *et al.*, 2010b). Mais le rôle de cette translocation et l'implication de la protéine CGI-58 dans ce processus restent à déterminer.

- ***Dans les tissus non adipeux :***

La protéine CGI-58 est aussi exprimée dans les tissus non adipeux, où d'autres membres de la famille des périlipines sont impliqués dans la régulation de la lipolyse (Lass *et al.*, 2006) (Subramanian *et al.*, 2004). Ces membres comprennent les périlipines-2 et 5 qui sont trouvées dans les tissus oxydatifs comme les muscles, le cœur et le foie. Des études ont montré la co-localisation de la périlipine-5 avec la protéine CGI-58 et l'ATGL (Granneman *et al.*, 2009a; Granneman *et al.*, 2011), une molécule de périlipine-5 se lie à l'une des deux protéines, mais pas aux deux en même temps. Il est supposé que cette interaction augmente la concentration

locale des deux protéines, ce qui aboutit à des interactions ATGL / CGI-58, et par suite une augmentation de la lipolyse.

L'activation maximale de l'ATGL est atteinte à des concentrations équimolaire de l'enzyme et de la protéine CGI-58 (Lass *et al.*, 2006). Il est important de mentionner que les deux protéines CGI-58 murine ou humaine activent bien mieux l'ATGL murine que l'ATGL humaine. Des études de mutation (Yang *et al.*, 2010b) (Schweiger *et al.*, 2008) (Gruber *et al.*, 2010) montrent que l'activation de l'ATGL par la protéine CGI-58 dépend de la séquence d'acides aminés présente dans le domaine *patatin* de la région N-terminale de l'ATGL, et que la région C-terminale a un effet inhibiteur sur l'activation de l'enzyme (Schweiger *et al.*, 2008). Cette inhibition est plus importante sur l'ATGL humaine que sur l'ATGL murine à cause de différences dans la région C-terminale des deux enzymes. Ces études renforcent le concept que la région *patatin* est responsable de l'activité enzymatique de l'ATGL et de son interaction avec la protéine CGI-58, alors que la région C-terminale de l'enzyme a un rôle régulateur et est responsable de l'interaction de l'enzyme avec la LD.

Jusqu'à présent, il n'est toujours pas clair si la liaison de la protéine CGI-58 à l'ATGL affecte la conformation de l'enzyme, facilite la présentation du substrat, ou augmente l'activité lipolytique de l'ATGL en éliminant les produits de la réaction du site actif de l'enzyme. Des études *in vitro* ou *in vivo* utilisant la complémentation de fluorescence bimoléculaire ont montré que l'activation de l'ATGL par la protéine CGI-58 nécessite une interaction directe protéine-protéine (Lass *et al.*, 2006) (Granneman *et al.*, 2007). Cependant, cette interaction n'est pas suffisante pour l'activation de l'ATGL, car des protéines CGI-58 tronquées, capables de se lier à l'ATGL, échouent à activer l'enzyme (Gruber *et al.*, 2010). De plus, il a été montré qu'une protéine CGI-58 tronquée des 149 acides aminés de sa région N-terminale était incapable de se lier à la LD et d'activer l'ATGL (Yang *et al.*, 2010a). L'implication de cette région N-terminale de la protéine CGI-58 dans la régulation de l'ATGL, a été étudiée en détail par Boeszoermyenyi *et al.* (Boeszoermyenyi *et al.*, 2015), où les auteurs ont montré que la séquence peptidique en N-terminal riche en tryptophanes (de la Val10 au Lys43) de la protéine CGI-58 est indispensable pour la liaison à la LD et l'activation de l'ATGL (**cf. III.2.3.3**). Il semble que l'interaction directe de l'ATGL et de la protéine CGI-58 ne soit pas suffisante pour l'activation de l'ATGL, et qu'une localisation en plus sur la LD soit nécessaire.

La protéine CGI-58 contient la séquence consensus de phosphorylation par les PKA (RKYS<sup>239</sup>S<sup>240</sup>) où S239 et S240 représentent les sites potentiels de phosphorylation. Récemment, Sahu-Osen *et al.* (Sahu-Osen *et al.*, 2015) ont montré que la Ser239 de la protéine CGI-58 murine est un substrat de la PKA. Mais ils ont trouvé que cette phosphorylation n'affecte pas la coactivation de l'ATGL *in vitro*. Par contre, ils ont trouvé que, *in vivo*, les protéines CGI-58 sauvage ou mutée en S239A/S240A, et sans activation par les PKA, seront localisées à la surface de la LD en présence des périlipines-1. Suite à l'activation des PKA, les périlipines phosphorylées ainsi que la protéine CGI-58 sauvage se dispersent dans le cytoplasme alors que la protéine mutée S239A/S240A reste sur la LD. Cela montre que cette phosphorylation est nécessaire pour la libération de la protéine CGI-58 de la surface des LD pour interagir avec l'ATGL.

### 3.2.2. Par la protéine G0S2 :

Récemment la protéine G0S2 a été identifiée comme un inhibiteur de l'ATGL en se liant directement au domaine *patatin* de l'ATGL (Yang *et al.*, 2010b), mais d'une manière non compétitive par rapport à la protéine CGI-58 (Schweiger *et al.*, 2008). Dans les adipocytes 3T3-L1, l'ATGL et la protéine G0S2 migrent à la LD suite à l'activation de la lipolyse (Yang *et al.*, 2010b), cela suggère que la protéine G0S2 est incapable de se lier à la LD toute seule, sans interaction avec l'ATGL.

Welch *et al.* (Welch *et al.*, 2009) ont montré que la protéine G0S2 est présente dans les mitochondries et interagit avec un facteur anti-apoptique (Bcl-2) altérant la perméabilité des membranes et induisant l'apoptose. La protéine G0S2 impliquée dans différents processus cellulaires peut donc être un lien entre le cycle cellulaire, la survie cellulaire, l'apoptose et la lipolyse. Un tel lien a été déjà prouvé chez les levures où la phase S de la mitose est connectée à l'activation de la protéine TGL4, orthologue de l'ATGL dans la levure (Kurat *et al.*, 2009).

### 3.2.3. Par les hormones :

La régulation de la lipolyse dans les adipocytes est prédominée par des phénomènes de phosphorylation et de translocation des enzymes lipolytiques suite à des signaux hormonaux (catécholamines et insuline). Le mécanisme moléculaire aboutissant à l'activation de la HSL a été bien étudié et clarifié. Les expériences d'inactivation du gène de la HSL ont montré que la lipolyse adipocytaire est toujours stimulée par les médiateurs  $\beta$ -adrénergiques, ce qui suggère la présence d'une enzyme hormono-sensible (Osuga *et al.*, 2000) (Okazaki *et al.*, 2002) (Haemmerle *et al.*, 2002a) (Mulder *et al.*, 2003) autre que la HSL. Après la découverte de l'ATGL et l'utilisation des souris ATGL<sup>-/-</sup>, il était devenu évident que l'activation  $\beta$ -adrénergique de l'ATGL est primordiale pour une lipolyse totale hormono-dépendante dans le tissu adipeux blanc. En absence d'ATGL, la mobilisation des AGNE et du glycérol en réponse à un stimulus  $\beta$ -adrénergique est diminuée de 70 % (Zimmermann *et al.*, 2004) (Haemmerle *et al.*, 2006) (Schweiger *et al.*, 2006).

### 3.2.4. Par les périlipines :

Le mécanisme moléculaire régulant l'activité de l'ATGL en réponse à des stimulations  $\beta$ -adrénergiques est mal connu. Des résultats récents suggèrent un mécanisme indirect impliquant la périlipine-1 et la protéine CGI-58. L'expression de la périlipine-1 s'effectue dans les tissus activés par une stimulation  $\beta$ -adrénergique tels que le tissu adipeux et les cellules stéroïdogéniques. En effet, l'activité de l'ATGL est régulée par la disponibilité de son cofacteur, la protéine CGI-58. Dans les adipocytes non stimulés, la protéine CGI-58 est localisée à la surface des LD et liée aux périlipines-1 (Granneman *et al.*, 2009a) (Granneman *et al.*, 2007) (Subramanian *et al.*, 2004). Dans les conditions stimulées, les périlipines-1 sont phosphorylées par la PKA dépendante de l'AMPc, cela provoque la dissociation de la protéine CGI-58 des périlipines-1, et qui devient par conséquent disponible pour l'activation de l'ATGL (Granneman *et al.*, 2007) (Subramanian *et al.*, 2004). Granneman *et al.* (Granneman *et al.*, 2009a) ont publié les sites de phosphorylation (la Ser492 et la Ser517) des périlipines-1 responsables de la liaison réversible avec la protéine CGI-58. Ces observations

indiquent que l'activation de l'ATGL dans le tissu adipeux blanc est contrôlée par les périlipines-1 *via* une interaction avec son cofacteur d'une manière AMPc dépendante.

Dans les tissus non-adipeux où l'expression des périlipines-1 est très faible voire inexistante, l'activation de la lipolyse est encore moins connue. L'ATGL et la protéine CGI-58 jouent un rôle très important dans l'hydrolyse des TG et particulièrement dans les tissus à haut besoin d'AGNE comme les muscles squelettiques, le cœur et le foie (Haemmerle *et al.*, 2006). Un mécanisme alternatif et indépendant de la périlipine-1 doit donc exister pour la régulation de l'activité de l'ATGL dans ces tissus. Listenberger *et al.* (Listenberger *et al.*, 2007) et Bell *et al.* (Bell *et al.*, 2008) ont démontré qu'une autre protéine de la famille "PAT", la périlipine-2, régule l'accès de l'ATGL à la LD dans plusieurs lignées cellulaires. Dans les souris déficientes en périlipine-1, la périlipine-2 est la protéine majeure de surface de la LD (Tansey *et al.*, 2001). Il est inconnu à ce jour si la régulation de l'ATGL par les périlipines-2 dans les tissus adipeux et non-adipeux implique des liaisons réversibles entre la protéine CGI-58 et les périlipines-2.

La périlipine-3 est aussi exprimée dans pratiquement tous les types cellulaires. Dans les hépatocytes murins, l'inhibition de l'expression des périlipines-3 conduit à une réduction du nombre et une augmentation de la taille des LD. De plus, une augmentation de la lipolyse associée à une localisation accrue de l'ATGL sur les LD a été observée dans ces cellules (Bell *et al.*, 2008). Il a été donc proposé que les périlipines-3 aient un rôle protecteur des LD en empêchant l'accès de l'ATGL à celles-ci.

La périlipine-4 a été trouvée essentiellement dans le tissu adipeux blanc et à faible degré dans les muscles squelettique et le cœur (Wolins *et al.*, 2003), mais aucune informations n'est disponible sur son implication dans la voie de la lipolyse (Wolins *et al.*, 2005). La périlipine-5 est exprimée majoritairement dans les tissus oxydatifs comme dans le cœur, les muscles squelettiques et le foie (Yamaguchi *et al.*, 2006) (Wolins *et al.*, 2006) (Dalen *et al.*, 2007). A jeun, la périlipine-5 induit la fragmentation des LD et la lipolyse (Wolins *et al.*, 2006). Il a été montré qu'elle interagit avec la protéine CGI-58, et que son expression augmente la présence de l'ATGL et de la protéine CGI-58 sur la LD (Granneman *et al.*, 2009b). Ces observations peuvent indiquer que la périlipine-5 régule la mobilisation et l'oxydation des AGNE dans les tissus ayant une forte activité oxydative tels que le muscle et le foie (Kuramoto *et al.*, 2012).

### **3.2.5. Par phosphorylation :**

L'ATGL humaine est phosphorylée sur deux sites, la Ser404 et la Ser428 (respectivement Ser406 et Ser430 pour l'ATGL murine), dans la région C-terminale (Bartz *et al.*, 2007) (Zimmermann *et al.*, 2004), mais l'implication de cette phosphorylation dans la régulation de l'activité enzymatique n'est pas claire. A la différence de la HSL, la phosphorylation de l'ATGL n'implique pas la PKA (Zimmermann *et al.*, 2004), et la présence des deux sites de phosphorylation n'est pas nécessaire pour la distribution de l'enzyme sur la LD ou l'hydrolyse des TG *in vitro* (Duncan *et al.*, 2010).

Pour vérifier si l'ATGL est phosphorylée par la PKA, des extraits de cellules HepG2 infectées par l'ATGL ont été incubés avec du  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP en la présence ou absence de la sous-

unité catalytique de la PKA. Des cellules infectées par la HSL ont été utilisées comme témoin positif. L'analyse de la phosphorylation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) et par autoradiographie a révélé que la HSL ainsi que l'ATGL sont phosphorylées par des kinases endogènes (Zimmermann *et al.*, 2004). L'ajout de la PKA augmente la phosphorylation de la HSL d'un facteur 26, par contre la phosphorylation de l'ATGL augmente marginalement d'un facteur 2. De plus, l'ajout de  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP et de la PKA dans le milieu réactionnel n'affecte pas l'activité de l'ATGL, par contre celle de la HSL augmente significativement (56 %). Ceci montre que l'ATGL n'est pas une cible spécifique de la PKA, et qu'elle est phosphorylée par d'autres kinases endogènes (Zimmermann *et al.*, 2004).

Il a été montré que l'orthologue de l'ATGL dans *C. elegans* l'ATGL-1 est phosphorylée par les AMPK sur plusieurs sites, provoquant l'inactivation de l'enzyme (Narbonne and Roy, 2009). Cette inactivation prolonge la survie des larves pendant la phase dormante (Narbonne and Roy, 2009). Par ailleurs, en 2011 Ahmadian *et al.* (Ahmadian *et al.*, 2011) ont montré que l'ATGL chez les mammifères est phosphorylée par les AMPK sur le résidu Ser406 (ATGL murine), et que cette phosphorylation active l'ATGL et améliore la lipolyse.

En utilisant une approche de protéomique fonctionnelle, Xie *et al.* ont montré récemment (Xie *et al.*, 2014) que l'ATGL murine peut être phosphorylée sur au moins 8 sites de phosphorylation différents. La phosphorylation de l'ATGL sur la Thr372 module négativement l'activité de l'ATGL empêchant ainsi sa translocation sur la LD.

### 3.2.6. Par régulation de la transcription :

L'expression de l'ATGL est régulée par différents effecteurs. Il a été montré que l'enzyme est activée pendant la différenciation des adipocytes (Zimmermann *et al.*, 2004) (Villena *et al.*, 2004), et qu'elle est une cible du facteur de transcription PPAR $\gamma$  (Kim *et al.*, 2006) (Kershaw *et al.*, 2007) (Festuccia *et al.*, 2006), et le facteur de transcription insulino-dépendant FoxO1 (Chakrabarti and Kandrór, 2009). De plus, des molécules comme le dexaméthasone (un glucocorticoïde) (Villena *et al.*, 2004), le thiazolidinediones (agoniste de PPAR $\gamma$ ) (Kim *et al.*, 2006) (Kershaw *et al.*, 2007) (Festuccia *et al.*, 2006) (Liu *et al.*, 2009) et le jeûne, augmentent l'expression de l'ARNm codant l'ATGL. Au contraire, d'autres molécules comme l'insuline (Kim *et al.*, 2006) (Jocken *et al.*, 2007) (Kralisch *et al.*, 2005), le TNF- $\alpha$  (Kim *et al.*, 2006; Kralisch *et al.*, 2005), le complexe mTor 1 (Chakrabarti *et al.*, 2010) et l'alimentation diminuent l'expression de l'ARNm codant l'ATGL.

Les promoteurs des gènes *ATGL* (*PNPLA2*) qui régulent l'expression par voie hormonale ou tissu-spécifique ne sont pas encore bien caractérisés. En 2006, Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2006) ont découvert une séquence, sur le gène *ATGL* murin, de site de fixation du facteur de transcription PPAR $\gamma$  (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes de type gamma).

Récemment, Das *et al.* (Das *et al.*, 2015) ont montré que le miRNA-124a inhibe jusqu'à 40 % la lipolyse des TG par régulation, au niveau de l'ARN messager, de l'expression de l'ATGL et de son cofacteur, la protéine CGI-58, dans le tissu adipeux blanc et dans le foie. En



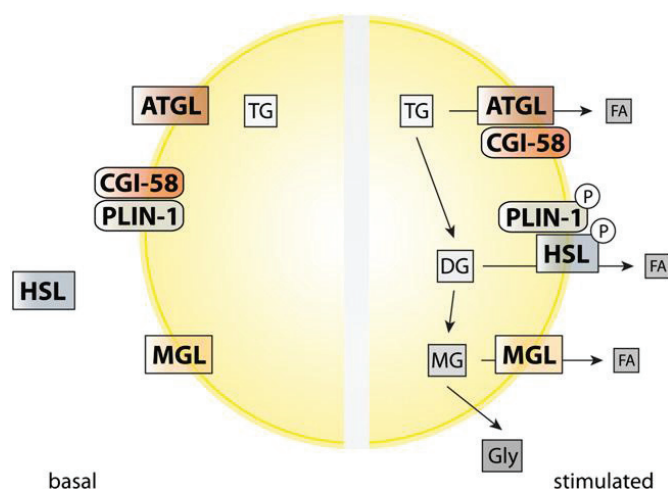
fait, ils ont trouvé que le miRNA-124a interagit avec une séquence de 23 bp localisée en 3' dans la région non traduite (3'-UTR) de l'ARN messager codant l'ATGL ou codant la protéine CGI-58, mais pas sur les gènes *Hsl*, *Mgl* ou *G0s2*. Cette régulation est spécifique et dépendante de ces 23 pb en 3'UTR ; la délétion de cette séquence abolit l'effet inhibiteur du miRNA-124a vis-à-vis des gènes *Atgl* et de *Cgi58*.

### 3.2.7. Par les acyl-CoA à longue chaîne :

Nagy *et al.* (Nagy *et al.*, 2014) ont montré que l'ATGL peut être inhibée par des longues chaînes d'acyl-CoA (comme l'oléoyl-CoA) d'une manière non compétitive comme dans le cas de la HSL, et très marginalement inhibée par les chaînes moyennes d'acyl-CoA, les DG, les MG ou les AGNE. Ils ont trouvé aussi que l'acyl-CoA ne perturbe pas la liaison de l'ATGL avec la protéine CGI-58, et que cette inhibition est indépendante de la présence de la protéine CGI-58 et qu'elle se fait directement sur le domaine N-ter de l'ATGL. Cette inhibition peut représenter un mécanisme de rétrocontrôle efficace contre la lipotoxicité due à l'activité de l'ATGL et de la HSL.

## 4. Modèle hypothétique de la lipolyse :

Jusqu'à ce jour, la lipolyse adipocytaire reste difficile à expliquer vu le nombre de protéines intervenant dans ce mécanisme. De ce fait, plusieurs modèles hypothétiques ont été suggérés. La **figure 24** représente la cascade lipolytique impliquée dans le tissu adipeux.



**Figure 24 :** Modèle hypothétique de la lipolyse basale et stimulée dans les adipocytes. Lipolyse basale (à gauche): la périlipine-1 (PLIN-1) et la protéine CGI-58 forment un complexe sur la LD. L'ATGL est localisée partiellement sur la LD tandis que la HSL est cytosolique. Lipolyse stimulée (à droite) : activation de la PKA et phosphorylation de la HSL ainsi que les périlipines ce qui libère la protéine CGI-58 qui se lie à l'ATGL et initie la lipolyse des TG d'une part, et induit la translocation de la HSL phosphorylée à la LD en s'associant aux périlipines pour catalyser l'hydrolyse des DG, d'autre part. La MGL hydrolyse les MG en AGNE et glycérol. D'après (Young and Zechner, 2013).

Dans les conditions basales, l'ATGL est associée aux LD d'une manière indépendante de la périlipine. La protéine CGI-58 est liée à la périlipine-1 et facilite la lipolyse basale des TG par l'ATGL tout en libérant les DG et les AGNE. La HSL cytosolique a un accès limité aux TG stockés dans les LD ou les DG produits durant la lipolyse basale.



Dans les conditions stimulées par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques, on peut récapituler le mécanisme de la lipolyse par l'hypothèse suivante : dans un premier temps les hormones comme les catécholamines se lient au récepteur  $\beta$ -adrénergique et activent la protéine Gs, qui par la suite stimulent l'adénylate cyclase. L'augmentation des niveaux d'AMPc active les PKA qui vont phosphoryler les périlipines-1 et l'HSL. Les périlipines-1 phosphorylées facilitent l'activation de l'ATGL par la protéine CGI-58 et la translocation des enzymes du cytoplasme au LD. Ces deux enzymes (ATGL et HSL) hydrolysent les TG et les DG en MG, qui par la suite sont hydrolysés en glycérol et AGNE par la MGL.

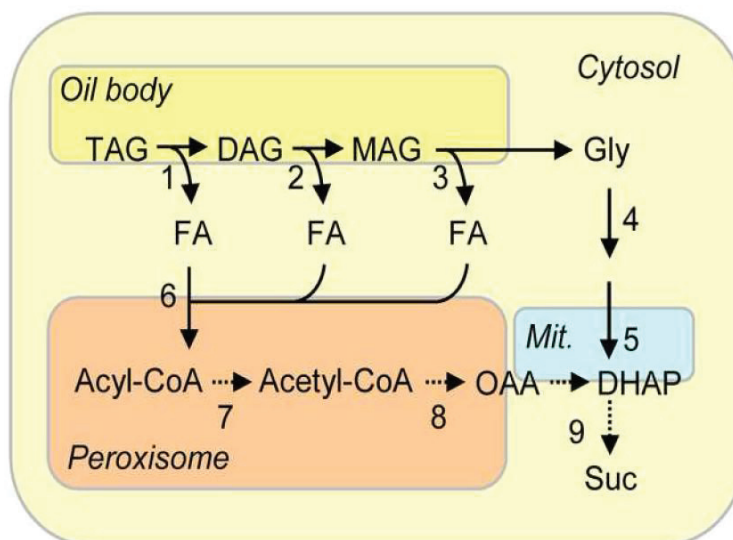
La stimulation hormonale de la lipolyse augmente de 100 fois la libération des AGNE du tissu adipeux vers la circulation sanguine ; l'ATGL, la HSL et la MGL sont responsables de plus de 90 % de la totalité de l'activité lipolytique dans le tissu adipeux blanc (Schweiger *et al.*, 2006).

Dans les tissus non-adipeux, le mécanisme de la lipolyse est mal connu. Malgré leur expression dans les tissus non-adipeux, l'activité de l'ATGL, HSL et MGL est beaucoup plus faible que dans les tissus adipeux. De plus, d'autres TG hydrolases pourraient contribuer à la lipolyse des TG dans le foie, les muscles et les macrophages (Quiroga and Lehner, 2012). Plusieurs tissus non-adipeux expriment des périlipines-2 et 5, mais pas ou peu de périlipines-1. On peut supposer d'après plusieurs études que ces deux périlipines-2 et 5 régulent l'activité de l'ATGL dans ces tissus en empêchant l'accès de l'ATGL à la LD (Listenberger *et al.*, 2007) (Bell *et al.*, 2008) (Granneman *et al.*, 2011) (Wang *et al.*, 2011) (Kuramoto *et al.*, 2012), mais le mécanisme détaillé de cette régulation est toujours non élucidé, vu que d'autres études ont montré la présence d'autres types de protéines et facteurs affectant la lipolyse dans les tissus adipeux et non-adipeux (Chung *et al.*, 2008) (Borg *et al.*, 2011).

## IV. La Lipolyse chez les plantes :

Les TG sont stockés dans des structures spécialisées chez les différents organismes, y compris les plantes, où ils sont nommés « oléosomes ». Lors de la germination des graines, les TG sont dégradés pour produire une source de carbone et d'énergie nécessaires pour alimenter la croissance post-germinative de l'embryon.

Ce processus, schématisé dans la **figure 25**, consiste, dans un premier temps, en l'hydrolyse des TG en AGNE et glycérol par les TG lipases. Ensuite, le glycérol est phosphorylé et transformé en dihydroxyacétone phosphate pour entrer dans le cycle de néoglucogénèse (Quettier *et al.*, 2008), alors que les AGNE sont transportés vers le peroxysome où ils seront activés en acyl-CoA puis  $\beta$ -oxydés. L'acétyl-CoA produit par cette oxydation sera par la suite intégré dans le cycle du glyoxylate, ceci aboutit à la formation de succinate qui est exporté vers la mitochondrie pour être converti en phosphoénolpyruvate. Finalement le phosphoénolpyruvate est converti en saccharose par glycolyse inverse dans le cytoplasme.



**Figure 25 :** Schéma représentatif de l'hydrolyse des TG au cours de la germination des graines. Les TG des oléosomes (*oil body*) sont hydrolysés en AGNE (FA) et glycérol par l'action successive d'une ou de plusieurs lipases (1, 2 et 3). Le glycérol (Gly) est converti en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par l'action de la Gly kinase (4) et la Gly-3-phosphate déshydrogénase (5). Les AGNE sont transportés vers le peroxysome où ils sont activés en acyl-CoA (6) puis  $\beta$ -oxydés (7). L'acétyl-CoA produit est ensuite transformé en acide organique comme l'oxaloacétate (OAA) par le cycle du glyoxylate (8). OAA et DHAP sont ensuite converti en sucre comme le saccharose (Suc) par la voie de la néoglucogénèse (9). Mit : mitochondrie ; D'après (Quettier *et al.*, 2008).

Il est intéressant de mentionner que la dégradation des TG a été aussi observée durant les phases avancées du développement des graines chez différentes espèces végétales et pas seulement pendant la germination. Cette dégradation compte pour à peu près 10 % de la diminution des TG dans les oléosomes (Chia *et al.*, 2005), mais le rôle de cette hydrolyse n'est pas encore clair.

L'homéostasie lipidique intracellulaire est vitale pour une structure et fonction cellulaire normale contre les différents stress environnementaux (Zhang and Rock, 2008) (Hermansson *et al.*, 2011) (Holthuis and Menon, 2014). A ce jour, la plupart des étapes enzymatiques régulant l'homéostasie lipidique sont bien définies au niveau génétique, par des mutations dans les organismes modèles et observations des différents phénotypes (Nohturfft and Zhang, 2009) (Chapman and Ohlrogge, 2012) (Henry *et al.*, 2012), alors que les signaux et les mécanismes régulant ces enzymes sont beaucoup moins connus (Nohturfft and Zhang, 2009) (Hermansson *et al.*, 2011) (Holthuis and Menon, 2014), et plus particulièrement chez les plantes (Bonaventure *et al.*, 2004) (Kunz *et al.*, 2009) (Zhang *et al.*, 2009) (Fan *et al.*, 2013) (Park *et al.*, 2013).

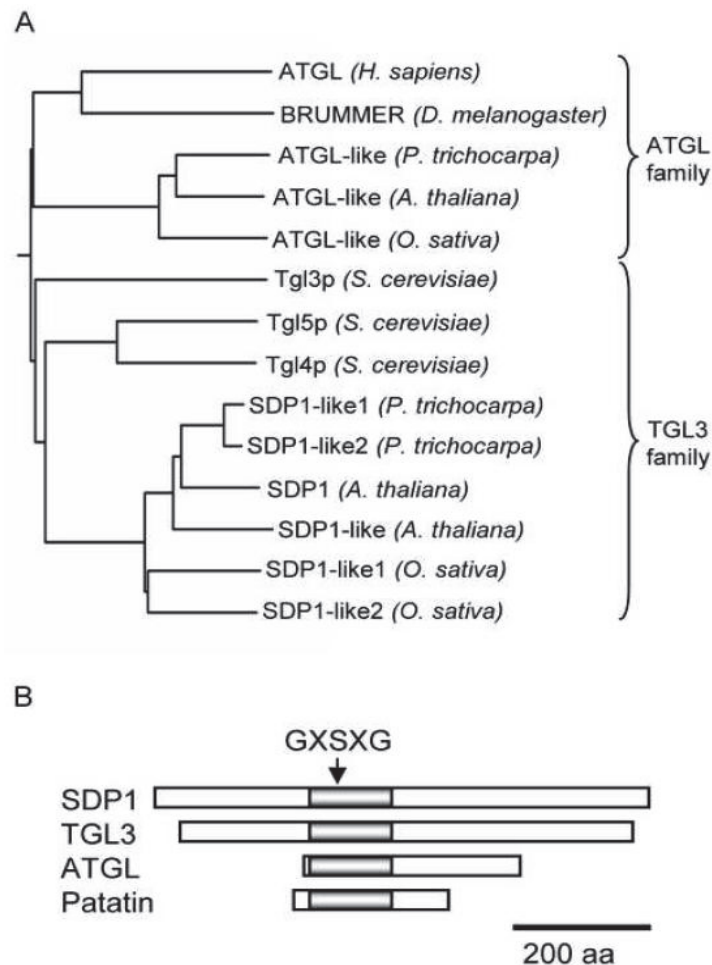
La recherche des lipases qui hydrolysent les TG pendant la phase post-germinative des graines a commencé depuis longtemps, mais c'est récemment que ces différentes protéines ont été identifiées.

### **1. Clonage et purification des lipases candidates :**

Plusieurs lipases ont été purifiées à partir des graines de plantes comme le maïs (Lin and Huang, 1984), le ricin (Maeshima and Beevers, 1985), et la *Vernonia* (Ncube *et al.*, 1995). Plus récemment, plusieurs gènes qui codent des protéines à activité TG hydrolase ont été clonés chez *A. thaliana* et chez d'autres espèces. Il s'agit de OBL1 "oil body lipase 1", protéine associée au LD chez le ricin (Eastmond, 2004), AtLIP1 (El-Kouhen *et al.*, 2005) et AtDAD1 (Ishiguro *et al.*, 2001) chez *Arabidopsis*, et LeLID1, une lipase homologue à DAD1 chez la tomate (Matsui *et al.*, 2004). Ces lipases clonées sont des  $\alpha/\beta$  hydrolases capables d'hydrolyser les TG. Plusieurs études *in vitro* ont été effectuées sur ces enzymes, mais leur rôle physiologique chez les plantes n'a été pas encore bien clarifié.

### **2. Identification de la lipase « Sugar dependent 1 » dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* :**

L'invalidation de gènes impliqués dans la mobilisation des TG chez *A. thaliana* provoque une perturbation de la croissance post-germinative. Ce phénotype peut être annulé en ajoutant une source alternative de carbone comme le saccharose dans le milieu de culture (Hayashi *et al.*, 2001) (Eastmond, 2006). Des graines d'*Arabidopsis* ayant ce phénotype saccharose-dépendant ont été criblées, et parmi les six loci isolés trois étaient impliqués dans l'hydrolyse des TG (Eastmond, 2006). Le premier locus muté, appelé *sugar-dependent 1* ou *sdpl* (**Figure 26**), a été localisé sur le chromosome 5, et le clonage du gène sauvage a montré qu'il code une lipase patatin-like, homologue à l'ATGL des mammifères, à la TG lipase 3 (TGL3), TGL4 et TGL5 de *Saccharomyces cerevisiae* à la protéine Brummer de *Drosophila melanogaster* (Athenstaedt and Daum, 2005) (Gronke *et al.*, 2005) (Zimmermann *et al.*, 2004) et à la phospholipase A<sub>2</sub> calcium-indépendante (iPLA<sub>2</sub>) humaine (Dessen *et al.*, 1999). Les protéines de cette famille « patatin » sont des sérines estérases (**Figure 26**) comme les  $\alpha/\beta$  hydrolases classiques, mais leur topologie est différente et leur mécanisme catalytique repose sur une diade catalytique Ser-Asp (Rydel *et al.*, 2003).



**Figure 26 :** (A) : Arbre phylogénétique des lipases de la famille *patatin-like*. (B) : Représentation schématique de la SDP1 d'*Arabidopsis*, de la TGL3 de levure, de l'ATGL humaine et de la protéine patatin de pomme de terre, montrant la position du domaine *patatin-like* (représenté en rectangle gris) contenant le motif GX SXG (d'après (Quettier *et al.*, 2008)).

L'activité de la SDP1 lipase peut être bloquée par le [E]-6-[bromoéthylène]-3-[1-naphthalényle]-2H-tetrahydropyran-2-one, un inhibiteur connu de l'iPLA<sub>2</sub>, indiquant une relation à la famille calcium indépendante iPLA<sub>2</sub>, et indiquant aussi que la protéine SDP1 utilise le même mécanisme que la iPLA<sub>2</sub> (Eastmond, 2006).

Plusieurs observations sur le phénotype des mutants *sdp1* suggèrent que la protéine SDP1 joue un rôle majeur dans l'hydrolyse des TG dans les graines germinatives d'*Arabidopsis* (Eastmond, 2006):

- les mutants *sdp1* sont déficients en activité lipase associée à la membrane de l'oléosome.
- les plantules de 5 jours poussant en présence de saccharose conservent leurs vésicules lipidiques intactes alors que normalement ces vésicules devraient être consommées à ce stade de croissance.

- les niveaux de TG dans les plantules sauvages diminuent normalement jusqu'à 95 % pendant les 5 premiers jours de la croissance post-germinative, alors que les niveaux de TG dans les plantules *sdp1* mutées ne diminuent que de 20 %.

La plante *Arabidopsis thaliana* contient une protéine homologue à la protéine SDP1 nommé SDP1-like ou SDPL et une autre protéine proche de l'ATGL humaine appelé ATGL-like (Eastmond, 2006) (**Figure 26 A**). Il a été montré que ces deux protéines SDPL et ATGL-like sont exprimées dans les graines (Eastmond, 2006). Un double mutant *sdp1/sdp1-like* a été créé, et l'analyse de son phénotype montre que la protéine SDP1L est responsable des 20 % d'hydrolyse de TG restante, observée dans le simple mutant *sdp1* (Eastmond, 2006).

La protéine SDP1 est fortement exprimée dans les graines, mais elle est aussi présente dans les différents tissus végétaux (Eastmond, 2006) (Kelly *et al.*, 2011). Il a été montré que la mutation du gène *sdp1* provoque une accumulation de lipides dans les tiges et les racines, mais il n'est pas encore clair pourquoi cette même mutation ne provoque pas d'accumulation des lipides dans les feuilles (Kelly *et al.*, 2013).

Une des explications pourrait être la présence d'une autre lipase candidate qui se trouve dans les tissus photosynthétiques. *A. thaliana* contient plusieurs gènes potentiels pour une telle fonction (Li-Beisson *et al.*, 2013). La protéine CGI-58 est une de ces candidates, vu qu'elle appartient à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases, et possède la triade catalytique caractéristique des carboxylester hydrolases à Serine (Carr and Ollis, 2009) (Zhang *et al.*, 1998) (Oberer *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que la mutation de la protéine CGI-58 chez les plantes provoque une accumulation des TG dans les feuilles jusqu'à 0,2 % du poids sec (James *et al.*, 2010), qui est une valeur beaucoup plus élevée que dans le cas de la mutation *sdp1* (Kelly *et al.* 2013). D'autres études ont impliqué PXA1 (un transporteur à ATP-binding cassette ou transporteur ABC dans les peroxysomes, responsable de l'importation des AG pour la  $\beta$ -oxydation (Zolman *et al.*, 2001), mais aussi les protéines SDP1 et SDP1L dans l'hydrolyse ces TG dans des tissus autres que les graines (Slocombe *et al.*, 2009) (Kelly *et al.*, 2013).

## 2.1. Localisation subcellulaire :

Le fait que les oléosomes des plantes mutées *sdp1* soient déficitaires en activité lipase suggère que la protéine SDP1 est une protéine associée à la membrane des oléosomes. L'analyse de la localisation subcellulaire de la protéine de fusion SDP1-GFP (green fluorescent protein), exprimée dans les cotylédons des plantules d'*Arabidopsis* (Eastmond, 2006), confirme cette localisation. Cette localisation des protéines à activité lipase sur les membranes des vésicules lipidiques a été rapportée pour toutes les protéines *patatin like* (Athenstaedt and Daum, 2005) (Gronke *et al.*, 2005) (Zimmermann *et al.*, 2004), toutefois le mécanisme d'interaction et d'adressage vers les corps lipidiques n'est pas encore entièrement compris. Les oléosines des plantes qui recouvrent la totalité des oléosomes et maintiennent leur structure, possèdent des longs domaines centraux hydrophobes qui les accrochent à la surface des lipides (Frandsen *et al.*, 2001), à la différence des protéines *patatin like*, qui ne possèdent pas un tel domaine. Par contre, des petites séquences hydrophobes se trouvent dans leurs séquences et sont probablement responsables de l'association de la protéine à la

membrane (Gronke *et al.*, 2005) (Athenstaedt and Daum, 2005) (Schweiger *et al.*, 2008). Cela a aussi été montré pour l'ATGL, qui possède une séquence hydrophobe dans sa région C-terminale se trouvant en dehors du domaine patatin. La délétion de cette partie C-terminale de l'ATGL conduit à une localisation cytosolique de la protéine (Schweiger *et al.*, 2008).

Chez les plantes, il a été aussi suggéré que les protéines recouvrant les oléosomes comme les oléosines ou les caléosines jouent un rôle dans la régulation de la lipolyse, en facilitant ou en empêchant l'accès de la lipase à la surface lipidique (Murphy, 2001) (Frandsen *et al.*, 2001), ayant donc un même rôle que les périlipines (protéines de la LD chez les mammifères) (Ducharme and Bickel, 2008). En plus de leur rôle dans la protection des TG contre l'hydrolyse dans les conditions basales, les périlipines jouent également un rôle dans le recrutement, la coordination et l'activation des lipases dans les conditions stimulées (Ducharme and Bickel, 2008).

Il a été montré que l'invalidation d'un gène de caléosine diminue le taux d'hydrolyse des TG dans les graines d'*Arabidopsis* (Poxleitner *et al.*, 2006), mais un mécanisme d'interaction chez les plantes entre les protéines d'oléosomes et les lipases n'a pas été encore identifié.

## **2.2. Spécificité de substrat :**

Les propriétés catalytiques de la protéine SDP1 sont très proches de celles rapportées pour la TG lipase de colza (Hills and Murphy, 1988) (Lin and Huang, 1983). Les deux ont un pH optimal neutre ou faiblement basique, et peuvent hydrolyser une large gamme de TG contenant de longues chaînes d'acides gras saturés ou insaturés.

L'activité lipasique mesurée dans les membranes des oléosomes des graines de colza était capable d'hydrolyser les TG, les DG et les MG (Lin and Huang, 1983). Par contre, la protéine SDP1 hydrolyse préférentiellement les TG, puis dans une moindre mesure les DG, et son activité est quasiment nulle envers les MG. Ces résultats supportent le fait que la protéine SDP1 est responsable de l'hydrolyse de la première liaison ester des TG dans les graines d'*Arabidopsis*. La même préférence a été montrée pour l'ATGL, la protéine BRUMMER de *Drosophile* et la TGL4 de levure (Gronke *et al.*, 2005) (Zimmermann *et al.*, 2004) (Kurat *et al.*, 2006). Par analogie avec la lipolyse adipocytaire, il est possible que des lipases, non encore identifiées, spécifiques des DG et MG associées à la membrane des oléosomes, opèrent en concertation avec la SDP1 pour l'hydrolyse complète des TG en AGNE et glycérol. Il est aussi possible que la protéine SDP1 et la protéine SDP1-like ayant des spécificités de substrats différentes soient responsables de la dégradation totale des TG dans les graines d'*Arabidopsis*.

## **2.3. Régulation :**

Puisque la protéine SDP1 est responsable de l'hydrolyse de la première liaison ester des TG, elle serait donc la cible primaire de la régulation de la lipolyse. En général, une très faible activité lipase est détectée dans les graines avant germination, cette activité augmente suite à la germination (El-Kouhen *et al.*, 2005) (Hills and Murphy, 1988). En fait, cette activité lipase



n'est pas corrélée au niveau de transcription de *sdp1*, qui semble être maximale pendant la maturation des graines, puis diminue avant la germination (Eastmond, 2006). Cette observation peut être expliquée par le fait que la régulation de la protéine SDP1 se fasse au niveau post-transcriptionnel.

Plusieurs études biochimiques suggèrent différentes formes de régulation de l'enzyme SDP1, soit une stimulation par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Hills and Beevers, 1987), soit une inhibition par les acyl-CoAs (Hills *et al.*, 1989). Une telle inhibition a été aussi montrée pour l'ATGL par les acyl-CoA à longues chaînes (Nagy *et al.*, 2014). Des études sur des mutants d'*Arabidopsis* supportent ce mécanisme d'inhibition ; il a été montré que des mutants d'*Arabidopsis* défectifs en peroxysomes, accumulent des acyl-CoA à longue chaîne et conservent le même taux de TG (Hayashi *et al.*, 2001) (Baker *et al.*, 2006).

Un autre niveau de régulation de la protéine SDP1 peut être son état de phosphorylation. La protéine SDP1 possède des sites potentiels de phosphorylation comme dans le cas de l'ATGL (Zimmermann *et al.*, 2004) (Bartz *et al.*, 2007) (Xie *et al.*, 2014) (Ahmadian *et al.*, 2011) et de la protéine TGL4 (Kurat *et al.*, 2009). De plus TGL4 a été identifiée comme cible de la protéine kinase cycline-dépendante Cdc28 (Ubersax *et al.*, 2003).

L'activité de la protéine SDP1 peut être aussi régulée par son interaction avec d'autres protéines, comme c'est le cas de l'ATGL, qui est activée suite à son interaction avec la protéine CGI-58. Les levures et *Arabidopsis thaliana*, possèdent tous deux un homologue de la protéine CGI-58, ICT1 et At4g24160 (ou AtCGI-58), respectivement. Comme la protéine CGI-58, ces deux homologues appartiennent à la famille  $\alpha/\beta$  hydrolase, mais ce qui est intéressant pour AtCGI-58 et ICT1 est que le motif GX SXG contient la sérine catalytique et celle-ci n'est pas remplacée par une asparagine comme c'est le cas de la protéine CGI-58 de mammifère (Ghosh *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2008a; Ghosh *et al.*, 2008b). Ces différentes protéines homologues contiennent également un second domaine, caractéristique d'une activité acyltransférase, composé d'His et Asp (HX<sub>4</sub>D) (Ghosh *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2008a; Ghosh *et al.*, 2008b). Par contre, jusqu'à présent, on ne sait pas si l'homologue de la protéine CGI-58 chez les plantes interagit et active la protéine SDP1 comme chez les mammifères.

Il a été montré que chez des mutants de la plante *A. thaliana*, déficitaires en rétromère fonctionnel, des anomalies dans le développement de la graine et de la plante, des altérations dans la maturation des oléosines, ainsi que la présence de petites vésicules lipidiques, ont été observées (Shimada *et al.*, 2006) (Pourcher *et al.*, 2010). Le rétromère est un complexe multi-protéique conservé chez les eucaryotes et impliqué dans le recyclage des récepteurs transmembranaires et le transport des protéines cargos de l'endosome vers l'appareil de Golgi (Attar and Cullen, 2010). Chez les mammifères, le rétromère est composé de deux sous-complexes : le premier composé d'un dimère de nexines (SNXs) et le deuxième composé d'un trimère de protéines appelé "vacuolar protein sorting" ou VPS, comportant les protéines VPS26, VPS29 et VPS35 (Attar and Cullen, 2010) (Wassmer *et al.*, 2009). Le génome d'*A. thaliana* contient des gènes codants tous les différents composants du complexe rétromérique, incluant donc trois gènes SNX désignés *SNX1*, *SNX2a* et *SNX2b*, trois gènes codants des

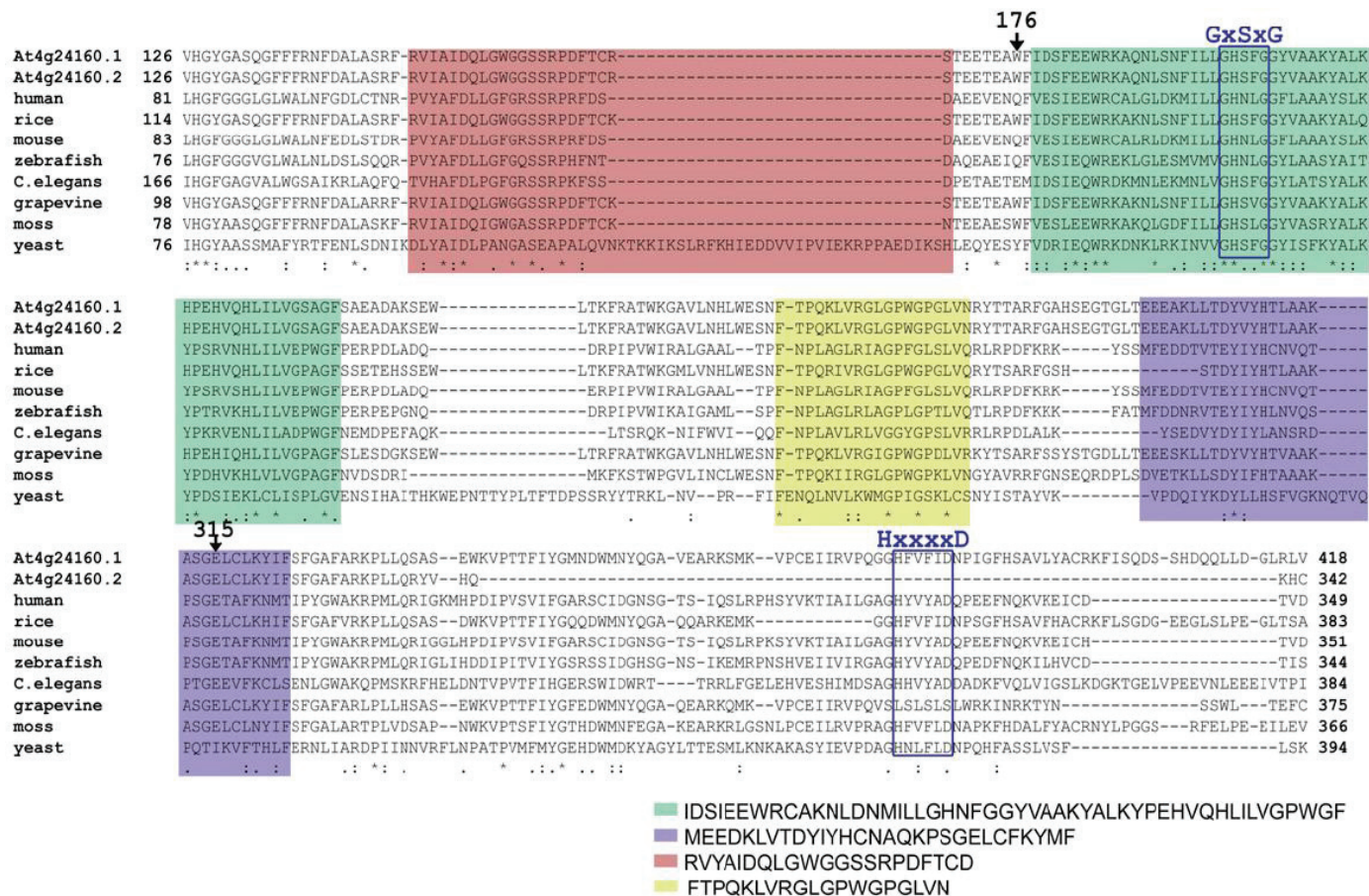
isoformes de la protéine VPS35 (*VPS35a*, *VPS35b* et *VPS35c*), deux gènes codant des isoformes de la protéine VPS26 (*VPS26a* et *VPS26b*) et un seul gène codant la protéine VPS29 (Pourcher *et al.*, 2010) (Jaillais *et al.*, 2007) (Vanoosthuysse *et al.*, 2003) (Oliviusson *et al.*, 2006).

Très récemment, Thazar-Poulot *et al.* (Thazar-Poulot *et al.*, 2015) ont montré que la mutation chez *A. thaliana* des protéines responsables de la formation du complexe rétromérique, provoque une déficience dans la biogénèse des oléosomes et provoque aussi leur dégradation pendant la germination. Ces auteurs ont montré aussi que la protéine SDP1 se trouve initialement tout autour des peroxysomes à l'état inactif, puis qu'elle migre à la surface des oléosomes *via* les tubulations des peroxysomes où elle hydrolyse les TG, et que l'absence d'un rétromère fonctionnel, retarde cette migration ; ceci suggère une relation entre la protéine SDP1 et les rétromères, et l'implication de ces derniers, et des peroxysomes, dans la régulation de la lipolyse chez les plantes.

### 3. L'homologue de la protéine CGI-58 chez *A. thaliana* :

*A. thaliana* (At) possède un homologue de la protéine CGI-58, le gène est localisé sur le locus *At4g24160* et s'exprime sous deux isoformes (*At4g24160.1* et *At4g24160.2*) ayant comme différence une portion dans la région 3', absente dans l'isoforme 2 (**Figure 27**) (James *et al.*, 2010). La forme la plus longue (forme 1) possède le motif HXXXXD dans sa région C-terminale, motif qui n'est pas présent dans la forme 2. De plus, la protéine CGI-58 d'*At* possède la sérine catalytique dans le motif GX SXG, remplacée par asparagine chez la protéine humaine (**Figure 27**).

La protéine CGI-58 joue un rôle important dans la signalisation et le métabolisme lipidique chez les mammifères ainsi que chez les plantes. Le dysfonctionnement de la protéine CGI-58 résulte chez les mammifères en une hyper-accumulation des TG dans les cellules et tissus qui ne stockent pas les lipides, comme dans la peau, le foie et les muscles (**cf. III.2.3**). Le même phénotype a été observé chez les plantes déficientes en CGI-58 avec une accumulation des TG dans le tissu mésophile (10 fois plus que le sauvage), alors que la quantité de TG dans les graines n'est pas affectée (James *et al.*, 2010). De plus, d'autres changements ont été observés dans la composition lipidique des membranes, comme pour les galactolipides des chloroplastes (par exemple le digalactosyl DG (DGDG), le monogalactosyl DG (MGDG), et le sulfoquinovosyl diglycéride (SQDG)) et quelques phospholipides comme le PG, alors que le taux de la plupart des autres phospholipides majeurs (comme la PC, PE, PI et PS) n'est pas affecté ; d'autre part, une diminution de la production de jasmonate et une réponse altérée à l'auxine ont été également observées (James *et al.*, 2010) (Radner *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent que la protéine CGI-58 joue un rôle dans le métabolisme des lipides dans les tissus autres que les graines chez les plantes.

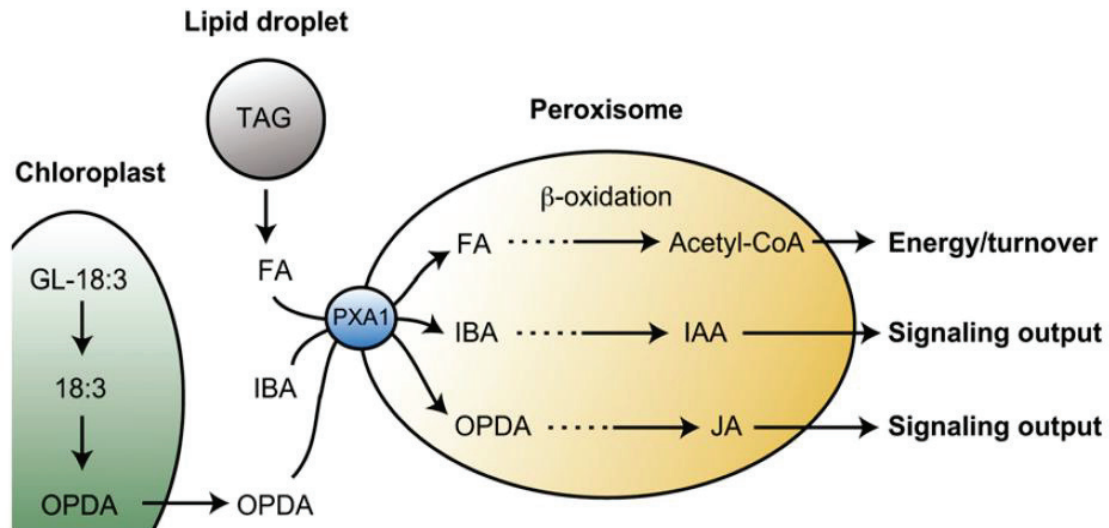


**Figure 27 :** Alignement de séquences peptidiques de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* (avec les deux variants At4g24160.1 et At4g24160.2), et son homologue chez le riz, le raisin, la souris, l'Homme, le poisson zèbre, *C. elegans*, la mousse (*Physcomitrella*) et la levure. L'analyse par MEME/MAST a révélé trois domaines identiques chez toutes les protéines (rouge, vert, jaune et bleu). Les acides aminés 176 et 315 correspondent aux résidus qui, par leur mutation dans la protéine humaine, empêchent la liaison à la LD. D'après (James *et al.*, 2010).

Malgré cette similitude dans le phénotype d'accumulation des lipides chez les plantes et les mammifères, il semble que la protéine CGI-58 possède un mécanisme d'action différent. Comme cela été déjà décrit dans la partie III.3.2, la protéine CGI-58 de mammifère interagit avec les périlipines des LD et active l'ATGL (Subramanian *et al.*, 2004) (Yamaguchi *et al.*, 2004) (Lass *et al.*, 2006), alors que chez les plantes, des homologues de la périlipine n'ont pas été trouvés (Chapman *et al.*, 2012), ce qui suggère d'autres interactions de la protéine CGI-58 avec d'autres protéines chez les plantes. L'analyse moléculaire a montré que la protéine CGI-58 joue son rôle biologique en interagissant avec différents types de protéines chez les plantes, différentes de celles retrouvées chez les mammifères. Il a été montré que chez les plantes, la protéine CGI-58 interagit et stimule notamment l'activité des transporteurs ABC des peroxysomes (PXA1) (Park *et al.*, 2013) (**Figure 28**). La protéine PXA1 est impliquée dans plusieurs voies de signalisation et de régulation du métabolisme, et est responsable de l'importation des AG à l'intérieur des peroxysomes (De Marcos Lousa *et al.*, 2013), pour la  $\beta$ -oxydation, et la génération d'énergie et de différents signaux lipidiques (Graham, 2008) (Theodoulou and Eastmond, 2012). La protéine PXA1 transporte des précurseurs hormonaux comme l'acide 12-oxo phytodiénoïque (OPDA) et l'acide indole-3-butyrique (IBA), vers l'intérieur des peroxysomes pour les transformer *via*  $\beta$ -oxydation en acide jasmonique (JA) et

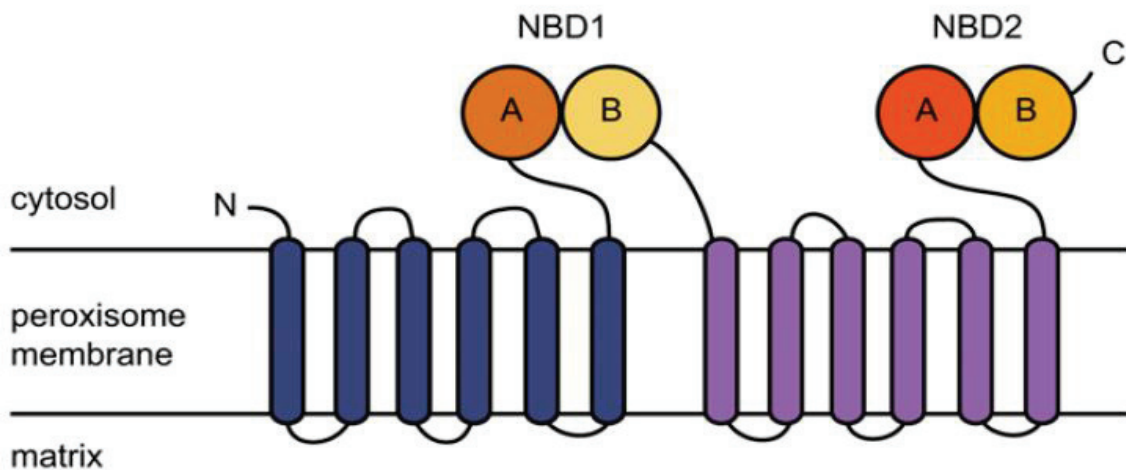


acide indole-3-acétique (IAA) respectivement (**Figure 28**) (Park *et al.*, 2013) (Zolman *et al.*, 2001) (Footitt *et al.*, 2002) (Hayashi *et al.*, 2002) (Theodoulou *et al.*, 2005) (Eastmond, 2006) (Dave *et al.*, 2011).



**Figure 28 :** Modèle de signalisation par la protéine PXA1 dans les cellules de plantes. D'après (Park *et al.*, 2013).

Sunjung Park *et al.* (Park *et al.*, 2013) ont montré que la protéine CGI-58 interagissait avec la partie C-terminale du motif de Walker (Walker B) de la protéine PXA1 peroxysomale (**Figure 29**).



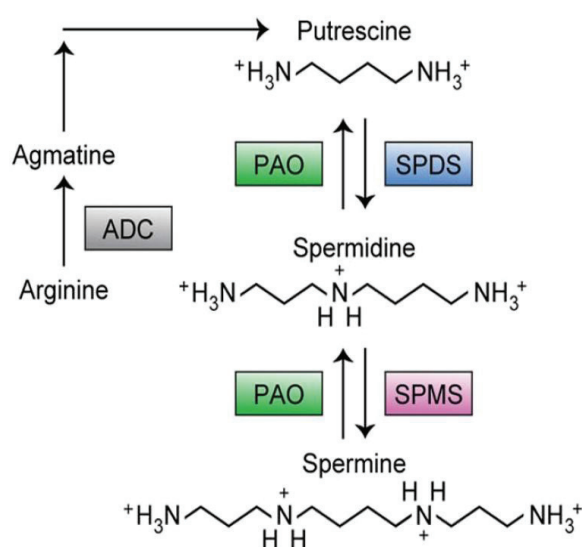
**Figure 29 :** Schéma représentatif de la structure de la protéine PXA1, un transporteur ABC, composé de deux régions dupliquées, chacune contenant six domaines intramembranaires et deux "nucleotide binding domain" (NBD) cytosoliques composés de deux motifs Walker A et B. D'après (Park *et al.*, 2013).

En utilisant des mutant *pxa1* et *cgi-58*, il a été montré (Park *et al.*, 2013) que cette interaction est nécessaire pour une régulation des niveaux de signaux lipidiques produits par les peroxysomes (comme le JA et l'IAA), et que la protéine CGI-58 jouait donc un rôle dans la régulation du transport des précurseurs IBA et OPDA à l'intérieur des peroxysomes.

De plus, il a été montré que la protéine CGI-58 de plante joue un rôle dans la régulation des taux de TG dans les feuilles, mais pas dans les graines (Park *et al.*, 2013), et comme il a été déjà montré, la protéine SDP1 est exprimée dans les graines, cela suggère donc l'absence d'une régulation de la SDP1 par la protéine CGI-58 dans les cellules de stockage de lipides chez les plantes. Il n'est pas encore clair si la régulation du niveau de TG dans les feuilles *via* la protéine CGI-58 se fait par activation de la protéine SDP1, vu qu'elle est exprimée aussi dans d'autres tissus que les graines, ou se fait par interaction avec d'autres lipases.

Sachant que la protéine CGI-58 possède aussi un domaine de liaison aux lipides (Ghosh *et al.*, 2009), elle pourrait donc jouer un rôle dans le transport des AGNE et des différents précurseurs lipidiques vers PXA1. De plus, une publication récente de De Marcos Lousa *et al.* (De Marcos Lousa *et al.*, 2013) démontre une activité hydrolase de PXA1 vis-à-vis des acyl-CoA ; en fait, jusqu'à présent, il n'est toujours pas clair si PXA1 transporte les AGNE à l'intérieur des peroxysomes sous forme neutre ou sous forme d'un acyl-CoA. Dans ce modèle, la protéine CGI-58 pourrait interagir avec PXA1 et stimuler son activité acyl-CoA hydrolase pour faire passer donc l'acyle à travers le transporteur.

Une autre étude (Schumacher *et al.*, 1999) a montré que la protéine CGI-58 interagissait aussi avec de-etiolated 3 (DET3), une sous-unité de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, et Park *et al.* ont montré une relation entre la protéine CGI-58 et la régulation du métabolisme des polyamines chez les plantes, par interaction avec la spermidine synthase 1 (SPDS1) (Park *et al.*, 2014). SPDS1 est bien connue pour son rôle dans le métabolisme des polyamines chez les plantes (**Figure 30**) (Imai *et al.*, 2004) (Hewezi *et al.*, 2010). Les polyamines sont très abondantes chez les plantes, ce sont des polycations aliphatiques qui se trouvent, soit sous forme libre, soit conjugués à d'autres molécules (Fellenberg *et al.*, 2012), et qui jouent un rôle important dans la croissance, le développement et la réponse au stress (Kusano *et al.*, 2008) (Alcazar *et al.*, 2010) (Wimalasekera *et al.*, 2011). Comme montré dans la **figure 30**, le métabolisme des polyamines commence avec l'arginine et inclut 3 polyamines : la putrescine, la spermidine et la spermine.



**Figure 30** : Modèle du métabolisme des polyamines chez les plantes. ADC : arginine décarboxylase ; PAO : polyamine oxydase ; SPDS : spermidine synthase ; SPMS : spermine synthase. D'après (Park *et al.*, 2014).

Il a été montré que la protéine CGI-58 interagissait avec la partie C-terminale de SPDS1, mais pas avec SPDS2, une isoforme de SPDS1 avec 75 % d'identité de séquence polypeptidique, ni avec la spermine synthase (SPMS) (**Figure 30**) (Park *et al.*, 2014). De plus, il a été montré que la mutation de la protéine CGI-58 entraîne une augmentation des taux de putrescine, le même phénotype a été observé pour la mutation de SPDS1 (Alcazar *et al.*, 2011) ce qui montre un rôle régulateur supplémentaire pour la protéine CGI-58 dans le métabolisme des polyamines.

### 3.1. Activité enzymatique de la protéine CGI-58 d'*A. thaliana* :

L'acylation du glycerol-3-phosphate (G3P) est la première étape dans la biosynthèse des glycérolipides chez les plantes. La plupart des enzymes impliquées dans cette voie de synthèse ont été montrées comme membranaires (Somerville and Browse, 1991). Une G3P acyltransférase soluble a été rapportée chez les plantes, elle est responsable de l'acylation du G3P en lysoPA (Murata and Tasaka, 1997). Le rôle des autres enzymes dans la voie de synthèse des glycérolipides est bien documenté, comme la MG acyltransférase cytosolique (Tumaney *et al.*, 2001), la DGAT (Ohlrogge and Browse, 1995 ; Saha *et al.*, 2006) et la lysoPA phosphatase (Shekar *et al.*, 2002). En 2009, Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009) ont identifié la protéine CGI-58 de plante comme étant une acyltransférase à activité LPAAT, transformant un lysoPA en PA.

L'équipe (Ghosh *et al.*, 2009) a surexprimé la protéine recombinante CGI-58 de plante, étiquetée par une étiquette 6xHis en N-terminale, dans la souche BL21 (DE3) d'*E. coli* en utilisant le plasmide pREST A. La protéine recombinante a été ensuite purifiée en utilisant une chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Ni-NTA). Il faut mentionner que la purification a été faite à partir des corps d'inclusions, et en conditions dénaturantes en présence de 6 M d'urée, en absence d'une étape propre de renaturation, à part un lavage sur colonne par un tampon sans urée. Cette équipe a donc montré, en utilisant des produits radiomarqués, que cette fraction purifiée de la protéine CGI-58 possède une activité acyltransférase spécifique à l'accepteur LPA, de l'ordre de 4 nmol de PA formé par min par mg d'enzyme. Cette enzyme ne catalysait aucun transfert sur la lyso-PE, la lyso-PC, le G3P ou la lyso-PS. Ils ont également montré que la protéine CGI-58 était acyl-CoA dépendante avec une préférence pour l'oléoyl-CoA et le stéaroyl-CoA (Ghosh *et al.*, 2009). Ils ont montré de plus une activité TG lipase vis-à-vis de la trioléine, et une activité PLA<sub>2</sub> hydrolysant la PC en lysoPC et AGNE. Ces deux activités ont été montrées en utilisant des produits radiomarqués avec la même fraction purifiée, mais les activités étaient beaucoup plus faibles que l'activité LPAAT rapportée ; 7,5 pmol d'AG formés / h / mg de protéine pour l'activité PLA<sub>2</sub> et 20 pmol d'AGNE formé / h / mg de protéine pour l'activité TG lipase (Ghosh *et al.*, 2009). Les auteurs ont proposé que la protéine CGI-58 produisait donc le PA par son activité LPAAT, ou bien encore formait du DG par son activité TG lipase, DG qui sera utilisé par d'autres enzymes comme la DG kinase pour la formation du PA ou qu'elle maintenait ainsi un contrôle sur la quantité de PA par son activité PLA<sub>2</sub>.

L'activité LPAAT est cruciale pour le contrôle et le maintien du flux de lysoPA / PA, flux qui joue un rôle clé dans plusieurs aspects physiologiques chez les eucaryotes, comme la



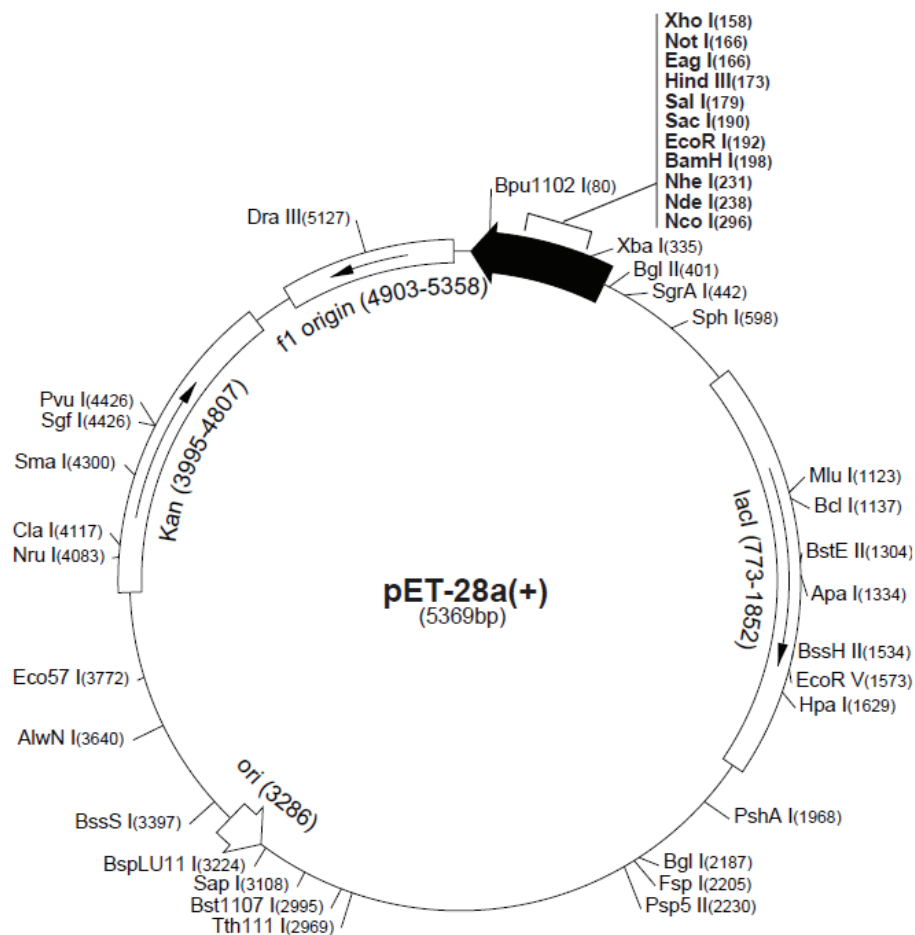
signalisation cellulaire, la polarité cellulaire et l'apoptose (Park *et al.*, 2004). Il a été montré que le PA régule les gènes impliqués dans la modulation et l'organisation cellulaires, et cible des protéines membranaires en modulant leurs activités catalytiques (Fang *et al.*, 2001) (Anthony *et al.*, 2004) (Zhang *et al.*, 2004) (Huang *et al.*, 2006). Chez les plantes, il a été aussi montré que le PA inhibe l'ouverture des stomates, et maintient donc l'hydratation des tissus (Mishra *et al.*, 2006), de plus le PA joue un rôle central dans la signalisation du stress chez les plantes, il est aussi produit soit par l'action de la phospholipase D sur un phospholipide, soit par l'action séquentielle sur un phospholipide, de la phospholipase C puis de la DG kinase (van Leeuwen *et al.*, 2004) (Wang, 2004) (Testerink and Munnik, 2005).

# MATERIEL ET METHODES

## I. Matériel :

### 1. Vecteurs de clonage :

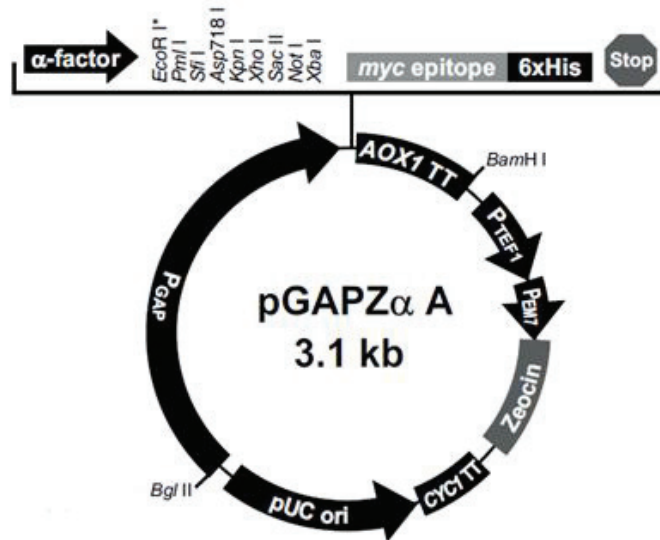
- Le plasmide **pET28b(+)** de 5368 pb de Novagen (**Figure 31**) permet l'expression de protéines recombinantes dans le système procaryotique *E. coli* par induction à l'isopropyl-D-thiogalactopyrannoside (IPTG). Il contient le promoteur T7, les inserts clonés dans ce plasmide pET28b(+) sont donc sous la dépendance de la T7 RNA polymérase. Ce plasmide contenant aussi une origine de réplcation f1, l'origine de réplcation *ori* est l'origine de réplcation bactérienne pMB1 (le plasmide est présent de 15 à 20 copies par cellule), et ce plasmide confère la résistance à la Kanamycine (Kan).



**Figure 31** : Carte du vecteur pET28a(+).

- Le plasmide **pGAPZaA** de 3147 pb d'Invitrogen (**Figure 32**), est un vecteur binaire qui permet l'expression constitutive de protéines recombinantes dans *Pichia pastoris*; il

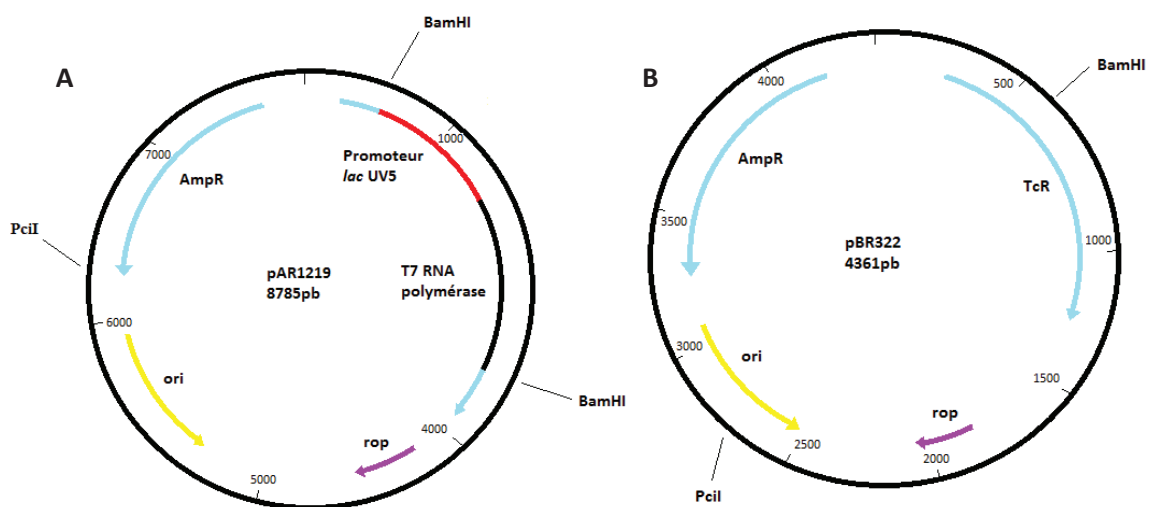
contient le promoteur constitutif de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (pGAP) et une séquence codant le peptide signal du facteur  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* qui permet la sécrétion de la protéine d'intérêt dans le milieu de culture. Un site multiple de clonage est présent entre le pGAP et la région de terminaison de transcription du gène AOX (promoteur du gène codant l'alcool oxydase 1). Le plasmide confère la résistance à la zéocine (**Figure 32**).



**Figure 32** : Carte du vecteur pGAPZ $\alpha$ A.

- Le plasmide pAR1219 de 8785 pb de Sigma-Aldrich (**Figure 33 A**) possède le gène de la T7 RNA polymérase inséré dans le gène de résistance à la tétracycline (Tc) du plasmide pBR322 (4361 pb) (**Figure 33 B**).

Le plasmide pAR1219 confère une résistance à l'Ampicilline (Amp), et possède l'origine de réplication bactérienne *ori* comme celle du plasmide pET28b(+).



**Figure 33** : Carte du vecteur pAR1219 (A) et du vecteur pBR322 (B).

- Le plasmide **pACYC184** de 4245 pb de New England BioLabs® (**Figure 34**) contient les gènes qui confèrent la résistance au chloramphénicol (Cm) et à la tétracycline (Tc). L'origine de réplication *p15A ori* permet la production de 10 à 12 copies du plasmide par cellule.

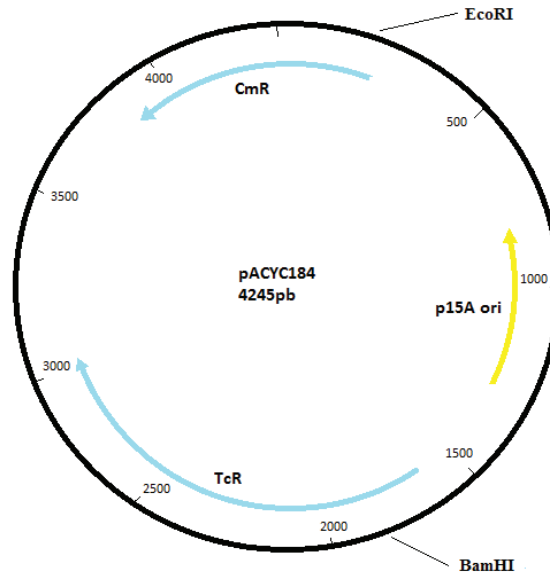


Figure 34 : Carte du vecteur pACYC184.

- Le plasmide **pYAT7** de 8694 pb (**Figure 35**) obtenu au laboratoire est dérivé de la fusion du gène codant la T7 RNA polymérase issu du plasmide pAR1219 et cloné dans le site BamHI (gène TcR) du plasmide pACYC184. Il contient le gène qui confère la résistance au chloramphénicol (CmR).

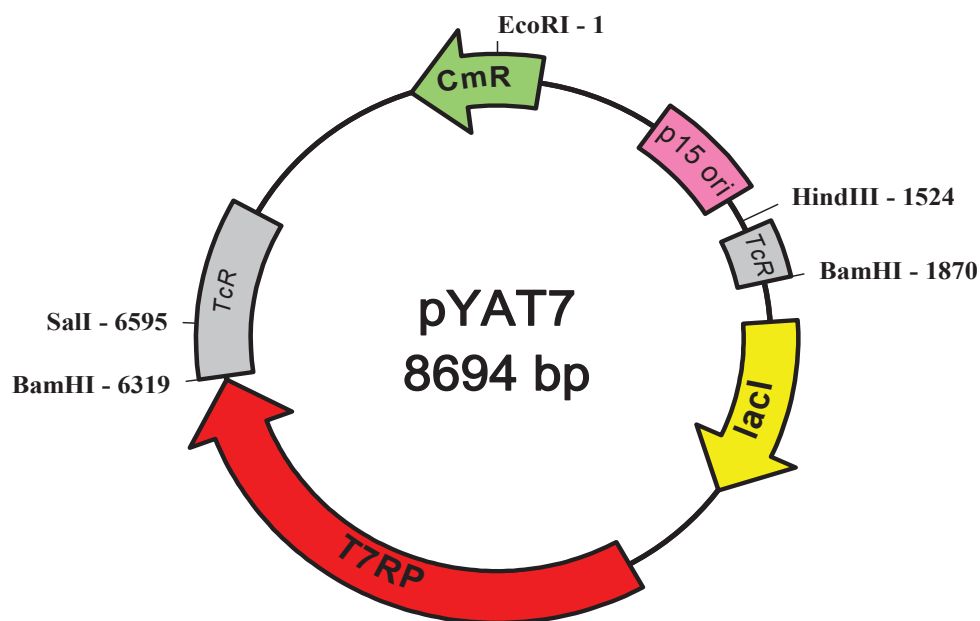


Figure 35 : Carte du vecteur pYAT7.

- Le plasmide **pAKT7** de 8492 pb (**Figure 36**) synthétisé au cours de cette thèse est issu de la fusion du gène de la *T7 RNA polymérase* cloné dans la cassette de résistance à la kanamycine du plasmide pACYC177. Le pAKT7 confère la résistance à l'ampicilline.

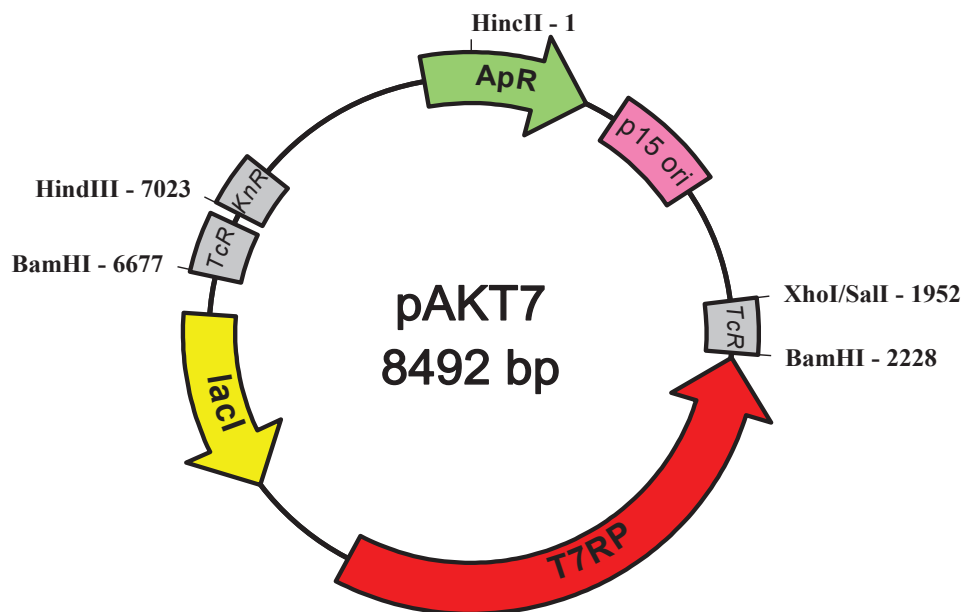


Figure 36 : Carte du vecteur pAKT7.

## 2. Souches utilisées pour le clonage et l'expression :

### 2.1. *Escherichia coli* :

Pour le clonage, la souche **Top10** d'*Escherichia coli* d'Invitrogen a été utilisée. Son génotype est le suivant : *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139* $\Delta(ara-leu)7697$ , *galK*, *rpsL(StrR)*, *endA1*, *nupG*.

Le génotype *mcrA* confère une absence de méthylation ou de restriction de l'ADN étranger ; par ailleurs cette souche est délétée des gènes *mrr* et *mcrBC*, responsables de la restriction de séquences d'ADN méthylées, et la mutation *hsdRMS* permet la transformation efficace de produit de PCR non méthylés. De même, la mutation *endA1* permet l'élimination des digestions non spécifiques par des endonucléases. La mutation *recA1* sur la recombinaise A1 réduit l'apparition fortuite de recombinaisons. Ces mutations permettent une plus grande compétence des cellules. Enfin, le génotype *rpsL(StrR)* indique que la souche est résistante à la streptomycine.

Pour l'expression des séquences clonées dans le vecteur pET28b(+), la souche **BL21-CodonPlus(DE3)** d'*E. coli* de Stratagene de génotype : *fhuA2 [lon] ompT gal ( $\lambda$  DE3) [dcm]  $\Delta hsdS$*  a été utilisée, elle contient le plasmide pRIPL (Novagen) codant des ARN de transfert (ARNt), rares chez *E. coli* et fréquents dans les séquences animales et/ou végétales utilisées, tels que argU (AGA, AGG), ileY (AUA), proL (CCC), leuW (CUA). Elle est utilisée notamment pour surexprimer des protéines recombinantes issues d'organismes riches en GC tels que la souris. Ce plasmide confère la résistance au chloramphénicol.

Le génotype  $\lambda$ DE3 indique que la souche possède le gène de la T7 RNA polymerase sous la dépendance du promoteur *lacUV5* inductible à l'IPTG. Cette souche permet la surexpression de protéines recombinantes dont le gène sera cloné en aval du promoteur T7, donc reconnu par la T7 RNA polymérase.

D'autres souches d'*E. coli* ont été utilisées dans les différents tests d'expression et de complémentation par la protéine CGI-58 :

- **La souche SM2-1** provenant de la collection CGSC (*Escherichia coli* Genetic Stock Center, Yale University, CT, USA) a pour génotype : *thr-1 araC14 tsx-78 Δ(galK-attLAM)99 hisG4(Oc) rfbC1 metC162::Tn10 plsC101(ts) rpsL136(strR) xylA5 mtl-1 thiE1*. Le génotype *metC162::Tn10* indique que la souche est résistante à la tétracycline et *rpsL136(strR)* indique que la souche est résistante à la streptomycine. La mutation *plsC101(ts)* est une mutation du gène *plsC* rendant le mutant sensible à une température supérieure à 30°C. Dans cette souche la croissance est température sensible, elle ne pousse pas à 44°C, pousse lentement à 37°C et correctement à 30°C, comparé à la souche sauvage (Coleman, 1990).

- **La souche DH5α™-T1R** kit GENEART (Life Technologies) est de génotype : *F- f80lacZAM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*. Cette souche mcrBC+ est capable de dégrader l'ADN méthylé. Elle est utilisée en mutagenèse dirigée car elle permet de discriminer l'ADN matriciel méthylé (qui sera donc dégradé) de l'ADN néosynthétisé par PCR non méthylé comportant la mutation désirée.

- **La souche NM1200** de génotype : *F- λ- rph-1 mini-λ-Red-cm* (Court *et al.*, 2003). Cette souche CmR est utilisée pour sa capacité à effectuer des recombinaisons homologues. La recombinase du phage  $\lambda$ , intégrée dans le génome bactérien, est inductible à 42°C.

- **La souche MN7** : provenant de la collection CGSC, (Nishijima *et al.*, 1981), de génotype : *F- thr-1 lpxB1(ts) lacY1 araC14 tsx-78 Δ(galK-attLAM)99 pgsA444 hisG4(Oc) rfbC1 rpsL136(strR) xylA5 mtl-1 thiE1*. Cette souche comporte une mutation *pgsA444* responsable d'une déficience dans la synthèse de PG.

- **La souche MG1655** : provenant de la collection CGSC, de génotype : *F- λ- rph-1*. La MG1655 a été la première souche utilisée dans les laboratoires comme souche universelle sauvage d'*E. coli* (Bachmann, 1997)

- **La souche SM105** : provenant de la collection CGSC, de génotype : *F- thr-1 araC14 tsx-78 Δ(galK-attLAM)99 hisG4(Oc) rfbC1 rpsL136(strR) xylA5 mtl-1 thiE1* (Galloway and Raetz, 1990). Cette souche correspond au *wild-type* de la souche SM2-1.

## 2.2. *Pichia pastoris* :

La souche X-33 (Invitrogen) de *Pichia pastoris* (génotype sauvage et phénotype Mut<sup>+</sup>) a été utilisée comme hôte pour l'expression des séquences clonées dans le plasmide pGAZαA.



### 3. Origine des ADNc codant les différentes protéines :

- **ATGL** : l'ADNc codant l'ATGL de *Mus musculus* provient de l'équipe du Pr. R. Zechner (Graz, Autriche) clonée initialement dans le vecteur pcDNA4/His Max.

Pour son homologue chez *Arabidopsis thaliana* (At1g33270), l'ADNc provient d'une banque d'ADNc de l'Université d'Ohio.

- **Protéine CGI-58** : l'ADNc codant la protéine murine provient de l'équipe du Pr. R. Zechner (Graz, Autriche).

L'ADNc codant la protéine CGI-58 murine étiqueté 12xHis en N-terminale provient de l'équipe du Pr. Brasaemle (Rutgers, The State University of New Jersey, USA).

Pour l'homologue de la protéine CGI-58 chez *Arabidopsis thaliana* (At4g24160), l'ADNc RAFL19-16-I19 provient du centre de science génomique RIKEN (Japon).

- **plsC** :

Le gène codant la protéine plsC sauvage a été amplifié à partir de la souche BL21(DE3) par PCR en utilisant les amorces AN180 et AN181 (**Tableau S1**), alors que le gène codant la protéine mutée plsC\*G39E a été amplifié de la souche SM2-1 en utilisant les mêmes amorces.

- **pgsA** :

Le gène codant la protéine pgsA sauvage a été amplifié à partir de la souche MG1655 par PCR en utilisant les amorces AN233 et AN234 (**Tableau S1**).

- **CotA** :

Le plasmide pET28b-CotA a été offert par Ligia Martins (ITQB, Université Nova de Lisbonne, Oeiras, Portugal) (Beneyton *et al.*, 2014).

### 4- Milieux de culture :

- **Milieu LB** (*Lysogeny Broth*) et **LB "low salt"** : ces milieux sont utilisés pour la culture des souches d'*E. coli* de clonage et d'expression. Si nécessaire la quantité de NaCl est divisée par deux pour le milieu "low salt" pour permettre l'action optimale de la zéocine. Pour 1 litre d'eau, 10 g bacto-tryptone, 5 g extrait de levure et 10 g de NaCl sont mélangés. Pour les milieux solides, 15 g d'agar par litre sont ajoutés. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 110°C.

Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations finales suivantes dans les milieux de culture : ampicilline 0,1 mg/mL, chloramphénicol 0,02 mg/mL, tétracycline 0,01 mg/mL, kanamycine 0,1 mg/mL, streptomycine 0,05 mg/mL. Une boîte de Petri contient 25 mL de LB solide avec un ou plusieurs antibiotiques. Les températures de culture varient selon les souches : les souches BL21(DE3), DH5 $\alpha$ , Top10 et MG1655 poussent à 37°C tandis que les souches SM2-1 et MN7 poussent à 30°C. Quand nécessaire, de l'IPTG, du CuSO<sub>4</sub> (250  $\mu$ M)

et de l'ABTS (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) (1 mM) ont été rajoutés dans les milieux.

- **Milieu YPD** (*Yeast-Peptone-Dextrose*) : ce milieu est utilisé pour la culture de la souche X33 de *P. pastoris*. Pour 1 litre d'eau, 10 g d'extrait de levure, 20 g de bactopectone et 10 g de glucose sont mélangés.

Pour les milieux solides, 15g d'agar par litre sont ajoutés.

## 5- Enzymes de modification :

- **Enzymes de restriction :**

La coupure enzymatique a été réalisée pour 2 h à 37°C avec 2 µg d'ADN et de 1 à 10 Unités ou U d'enzyme (quantité d'enzyme nécessaire pour digérer 1 µg d'ADN pendant 1 h à 37°C dans un volume total de 50 µL). Les enzymes utilisés sont : EcoRI, SstI ou SacI, NdeI, NotI, PciI, NcoI, XhoI, BamHI, BspHI (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** liste des différentes enzymes de restriction utilisées avec la séquence cible et le nom du fournisseur ; (-) : indique le site de clivage.

Nom de l'enzyme	Site de restriction (5'→3')	Fournisseur
EcoRI	G-AATTC	NEB <sup>®</sup> <sub>inc</sub>
SstI ou SacI	GAGCT-C	Jena Bioscience
NdeI	CA-TATG	NEB <sup>®</sup> <sub>inc</sub>
NotI	GC-GGCCGC	Jena Bioscience
PciI	A-CATGT	NEB <sup>®</sup> <sub>inc</sub>
NcoI	C-CATGG	NEB <sup>®</sup> <sub>inc</sub>
XhoI	C-TCGAG	Jena Bioscience
BamHI	G-GATCC	NEB <sup>®</sup> <sub>inc</sub>
BspHI	T-CATGA	NEB <sup>®</sup> <sub>inc</sub>

- **T4 DNA ligase :**

Cette enzyme est utilisée pour la liaison de deux fragments d'ADN. Des ligations de rapport molaire (1:1) et (1:3) (vecteur : insert) ont été faites avec des contrôles (1:0), pour 1 h à température ambiante dans le tampon fourni par le fabricant Invitrogen.

- **Polymérase :**

La Taq polymérase de *Thermus aquaticus* de chez *Invitrogen*<sup>TM</sup>, la KOD polymérase de *Thermococcus kodakaraensis* de chez *Novagen* et la Q5 polymérase de chez *NEB*<sup>® inc</sup> ont été utilisées.

## **6. Amorces et leurs cibles :**

Différentes amorces ont été utilisées pour construire et cribler les différents ligations et/ou vecteurs de transformation ; voir **Tableau S1** dans la partie annexe.

## **7. Lipides et réactifs radiomarqués :**

Les lipides, dioléoylphosphatidylcholine (DOPC), 1-palmitoyl 2-oléoylphosphatidylglycérol (POPG), et 1-oléoyllysoPG ont été achetés chez Avanti Polar (Alabaster, Alabama, USA). L'acide 1-oléoyllyosphosphatidique, l'acide oléique, et la trioléine ont été achetés chez Sigma Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France).

Les lipides radiomarqués [dipalmitoyl-1-<sup>14</sup>C] phosphatidylcholine ([<sup>14</sup>C]-DPPC) (111 mCi / mmol), l'[oléoyl-1-<sup>14</sup>C] oléoyl Coenzyme A (oléoyl-CoA) (53,7 mCi / mmol) et la [9,10-<sup>3</sup>H(N)] trioléine (108 Ci / mmol) ont été achetés chez Perkin-Elmer.

Pour l'analyse des lipides, par chromatographie sur couche mince (CCM), des plaques de silice ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> de chez Macherey Nagel ont été utilisées, alors que pour l'analyse des lipides radiomarqués des plaques en verre (Silica Gel G & GF Preparative Uniplat) de chez Analtech, Newark, USA, ont été utilisées.

La TLL a été offerte par Dr. S. Patkar (Novo-Nordisk, Copenhague, Danemark). La PLA<sub>2</sub> utilisée était celle de pancréas de porc (Sigma Aldrich Chimie, Saint Quentin Fallavier, France).

## II. Méthodes :

### 1. PCR « polymerase chain reaction » :

Plusieurs polymérases ont été utilisées avec des buts différents :

- **PCR avec la KOD polymérase (Novagen)** : C'est une polymérase utilisée pour la modification des gènes cibles (*ATGL* et *CGI-58*), en ajoutant des sites de restriction, des étiquettes 6xHis en N-terminal ou C-terminal, ou pour ajouter ou éliminer des parties de l'ADNc comme la séquence signal de gènes d'*Arabidopsis thaliana*. La KOD de *Thermococcus kodakaraensis* est une polymérase thermostable de haute-fidélité qui amplifie sa cible d'ADN avec une excellente précision et rendement. La KOD a une des plus basses fréquences de mutation parmi tous les autres polymérases à cause de son activité 3'→5' corrective exonucléase-dépendante. Parfois la Q5 polymérase (*NEB<sup>®</sup> inc.*), possédant les mêmes propriétés que la KOD polymérase, a été aussi utilisée.
- **PCR avec la Taq polymérase (Invitrogen<sup>TM</sup>)** : C'est une polymérase utilisée pour le criblage des clones où une haute fidélité n'est pas nécessaire, la Taq polymérase ne possède pas d'activité exonucléase 3'→5'.

Les réactions de PCR s'effectuent avec des amorces à 5 µM et une solution de dNTP (désoxyriboNucléoside TriPhosphate) à 2 µM, dans le tampon convenable pour chaque polymérase.

Le programme PCR commence par 5 minutes à 95°C (étape de dénaturation) puis trente cycles ont lieu où chaque cycle comprend trois étapes, 30 secondes à 95°C (étape de dénaturation de l'ADN), puis 30 secondes à 40°C (étape d'hybridation des amorces ; la température d'hybridation peut changer en fonction des amorces) et enfin 1 minute et 30 secondes à 72°C (étape de polymérisation des dNTP). Le programme PCR se termine par 3 minutes à 72°C.

- **PCR avec l'AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx polymérase** : Pour la mutagenèse dirigée, le kit GENEART<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis System est utilisé avec la polymérase AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx DNA polymerase. La réaction commence par une étape de 20 minutes à 37°C (méthylation de l'ADN par la méthylase) puis 2 minutes à 94°C (dénaturation de la méthylase et de l'ADN). Dix-huit cycles ont lieu ; un cycle comprend 20 secondes à 94°C (dénaturation de l'ADN) puis 30 secondes à 57°C (hybridation des amorces) et enfin 4 minutes et 30 secondes à 68°C (polymérisation). La fin de la PCR s'effectue à 68°C pendant 5 minutes.

### 2. Electrophorèse sur gel d'agarose :

La présence des différentes modifications sur l'ADN apportées par PCR, ou par enzymes de restriction, ainsi que les criblages de la présence des séquences d'ADN, ont toutes été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels d'agarose sont préparés à une concentration de 0,5-1 % (p/v) dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM pH 8, EDTA 1mM)

et en présence de bromure d'éthidium (1 µg/mL). Les échantillons sont additionnés à 0,2 volumes de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol FF 0,25 % (p/v), glycérol 30 % avant dépôt sur gel. La migration s'effectue dans un tampon de migration TAE à 100 V pendant 15 à 25 min. Les fragments d'ADN sont visualisés sous éclairage ultraviolet grâce au bromure d'éthidium. La taille et la concentration des fragments d'ADN séparés sur le gel sont estimées grâce à un marqueur de taille (1 kb de chez *Invitrogen*<sup>TM</sup>), migrant en parallèle des échantillons sur le gel.

### 3. Purification d'ADN :

- **ADN issu de PCR ou de réaction de digestion** : l'ADN, issu d'une réaction de PCR ou d'une digestion par des enzymes de restriction, a été purifié en utilisant des membranes à base de silice du kit « PCR purification » de Qiagen. La solution à purifier est mélangée avec un tampon de haute salinité puis passée sur une membrane de silice (qui permet l'adsorption de l'ADN), la membrane est ensuite lavée par un tampon de lavage contenant de l'éthanol, ce qui permet d'éliminer toutes les impuretés (comme les amorces de PCR, les nucléotides, les petits fragments nucléotidiques, l'agarose...). L'ADN est élué en ajoutant un tampon de faible salinité ou de l'eau. L'éthanol résiduel est ensuite évaporé pendant 20 minutes dans un dessiccateur.

- **ADN séparé sur gel d'agarose** : les fragments issus d'une digestion et visibles sur gel d'agarose sont découpés sous lampe UV, dissouts dans le tampon de solubilisation QG contenant 5,5 M de guanidine de thiocyanate (GuSCN) et 20 mM Tris HCl (pH 6,6), puis purifiés par le kit « Gel extraction » de Qiagen. Cette purification avec centrifugation s'effectue par adsorption sur une membrane de silice suivant les mêmes étapes que celles décrites ci-dessus.

- **ADN plasmidique** : l'ADN plasmidique a été purifié en utilisant la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions en utilisant le kit « Plasmid DNA purification » de Macherey-Nagel. Les cellules d'*E. coli* sont cultivées pendant une nuit avec les antibiotiques appropriés dans 200 mL de culture, puis centrifugés (4000 x g à 20°C pendant 10 min) et remises en suspension dans un tampon contenant de la RNase A, et ensuite lysées dans un tampon alcalin (pour casser la paroi cellulaire). Le lysat est précipité par un tampon, puis filtré sur colonne échangeuse d'anions. Une étape de lavage dans des conditions de concentration en sels modérées avec le tampon de lavage permet l'élimination des protéines, glucides et autres impuretés. Ensuite, l'ADN est élué puis précipité à l'isopropanol, lavé par l'éthanol 70 %, adsorbé sur un microfiltre (0,2 µm), séché pour éliminer l'alcool, et l'ADN plasmidique adsorbé est ensuite élué du filtre par de l'eau ultra pure.

### 4. Quantification et vérification de l'ADN :

Pour la quantification d'ADN, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop, Thermo Scientific) à 260 nm.

Toutes les séquences d'ADN construites ont été vérifiées par séquençage par la société Eurofins MWG (Ebersberg, Allemagne) par la méthode des didéoxynucléotides.

## 5. Clonage :

### 5.1. Amplification et modification des ADNc :

Les différents ADNc codant les protéines utilisées dans cette étude ont été modifiés et amplifiés par PCR avec la KOD polymérase en utilisant différentes amorces (**Tableau S1**) qui ont permis d'ajouter les sites de restriction convenables pour l'insertion de l'ADNc dans le vecteur d'expression, et ajouter une étiquette codant 6xHis en N-terminal et/ou en C-terminal sur la protéine recombinante.

### 5.2. Digestion des produits de PCR et des vecteurs :

Les produits de PCR sont digérés par les enzymes adéquates pendant 2 h à 37°C puis purifiés avec le kit « PCR purification » Qiaquick (Qiagen) (**cf. II.3**).

### 5.3. Déphosphorylation des plasmides :

Chaque plasmide, suite à sa digestion et avant sa purification, subit une étape de déphosphorylation de ses extrémités 5'-phosphate pour éviter par la suite, la re-ligation du vecteur sur lui-même. Cette déphosphorylation s'effectue avec la phosphatase Antarctique (New England BioLabs®) dans son tampon pendant 20 minutes à 37°C sous agitation. L'enzyme est ensuite inactivée en plaçant l'échantillon à 65°C pendant 5 minutes.

### 5.4. Ligation :

La ligation a été effectuée par la T4 DNA ligase, dans son tampon, pendant une heure à température ambiante avec ~100 ng de vecteur et 5 U de ligase dans un volume final de 20 µL. Les différentes ligations sont faites pour un rapport molaire vecteur : insert 1:1 ou 1:3, et avec un contrôle négatif 1:0 permettant de quantifier la re-circularisation du vecteur sur lui-même.

### 5.5. Transformation de la souche Top10 d'*E. coli* :

Deux types de transformation ont été utilisés :

- **Transformation par choc thermique** : 5 µL du milieu de ligation sont mélangés avec 30 µL de bactérie Top10 chimiocompétentes, puis incubés pendant 10 min dans la glace, puis 45 secondes à 42°C, et 5 min dans la glace. Un volume de 300 µL de milieu LB y est alors ajouté, puis le mélange est incubé pendant 40 min à 37°C sous agitation.

- **Transformation par électroporation** : 2 µL du milieu de ligation sont mélangés avec les bactéries Top10 électrocompétentes préalablement préparées par lavages extensifs à l'eau, et transformées par électroporation (2,5 kilovolt pour 5,9 ms) à l'aide d'un MicroPulser BioRad. Un volume de 300 µL du milieu LB y est ensuite ajouté, et les cellules sont incubées pendant 30 min à 37°C sous agitation. Les cellules transformées (100 µL) ont été étalées sur du milieu LB-agar contenant les antibiotiques appropriés et incubées une nuit à 37°C.



## **5.6. Analyse par PCR des clones recombinants et purification de l'ADN plasmidique :**

Les clones sélectionnés sur boîtes de Petri ont été mis en culture dans 3 mL de LB avec les antibiotiques appropriés pour une nuit à 37°C sous agitation. La vérification des transformants positifs a été faite ensuite par PCR en utilisant la Taq polymérase directement sur 1 µL de culture.

Un clone contenant le plasmide recombinant a été cultivé pendant une nuit avec les antibiotiques appropriés dans 200 mL de milieu LB et l'ADN plasmidique a été purifié par le kit « Plasmid DNA purification » de Macherey-Nagel (cf. II.3).

## **6. Expression de protéines recombinantes :**

Deux systèmes d'expression ont été utilisés, soit dans *E. coli* avec le plasmide pET28b(+), soit dans *P. pastoris* avec le plasmide pGAPZαA :

### **6.1. Expression dans *E. coli* :**

**6.1.1. Préparation des cellules compétentes :** Une culture sur la nuit, à 30 ou 37 °C, selon la souche d'*E. coli* à transformer (SM2-1, MN7, MG1655, BL21(DE3)), a été diluée au 50<sup>ème</sup> et cultivée jusqu'à une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,7 et 1. La culture a été ensuite centrifugée à 4000 x g à 4°C pendant 10 minutes et le culot a été lavé trois fois dans un grand volume d'eau glacée afin d'épurer les cellules des sels contenus dans le milieu de culture. Les cellules ont été finalement reprises dans 100 µL d'eau glacée par 50 mL de culture.

**6.1.2. Transformation de la souche :** 10 ng de plasmide (pET28b(+)) ou pYAT7 ou pAKT7) ont été transformés dans 50 µL de cellules électrocompétentes à l'aide d'un MicroPulser (BioRad) (2,5 kV pendant 5,9 ms). Les cellules transformées sont reprises dans 300 µL de LB et placées à 37°C ou 30°C selon les souches pendant 30 minutes puis 150 µL sont ensuite étalés sur milieu LB contenant l'antibiotique approprié.

**6.1.3. Induction et expression :** Une préculture du clone transformé a été réalisée pendant la nuit à 30 ou 37 °C, selon la souche, et sous agitation dans un milieu LB contenant les antibiotiques appropriés. Cette préculture est re-diluée au 1/10 dans du milieu LB et remise en culture à 30 ou 37 °C. L'expression de la protéine recombinante par les cellules d'*E. coli*, est induite par l'IPTG (1 mM final) lorsque la culture bactérienne atteint une DO<sub>600nm</sub> = 0,6 à 0,8. L'induction a été réalisée à 30 ou 37°C, selon la souche, pour au moins 3 h, alors que pour les tests d'expression à 4°C l'induction a été faite pour 15 h. Ensuite les cellules induites ont été récupérées par centrifugation à 4000 x g à 4°C pendant 20 minutes, puis le culot a été lavé à l'eau puis congelé à -20°C.

Pour les tests de complémentation sur boîte, les cultures liquides sont rediluées pour obtenir une culture à une DO de 1, puis diluées en cascade au 1/10<sup>ème</sup>, puis 10 µL des différentes dilutions sont déposés sur boîte.

## **6.2. Expression dans *Pichia pastoris* :**

**6.2.1. Préparation d'ADN :** l'ADN plasmidique recombinant (environ 10 µg) est linéarisé par BspHI pendant 1 h à 37°C, puis purifié (PCR purification kit, Quiagen).

**6.2.2. Préparation des cellules compétentes :** Une colonie isolée de *Pichia pastoris* est mise en culture dans un milieu YPD à 30°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600nm</sub> de 0,8 -1. Les cellules sont collectées par centrifugation et lavées par 25 mL d'eau, puis resuspendues dans 1 mL d'une solution de LiCl 100 mM qui permet de faire des pores dans la membrane cellulaire. Une étape de centrifugation permet d'éliminer le LiCl, et le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans 400 µL de LiCl 100 mM.

**6.2.3. Transformation :** Les cellules compétentes (50 µL) sont transformées par les plasmides recombinants (5-10 µg) dans une solution contenant du polyéthylène glycol 50 % (240 µL), du LiCl 1 M (36 µL), et de l'ADN de sperme de saumon (25 µL à 2 mg/mL). Le mélange est incubé à 30°C pendant 30 min sans agitation, puis à 42°C pendant 20-25 min. Les cellules sont alors centrifugées et le culot cellulaire est repris dans 1 mL du milieu YPD puis incubé à 30°C sous agitation pendant 2 h. Les cellules sont étalées sur du milieu YPD-agar contenant la zéocine à 100 µg/mL, puis incubées pendant 2-3 jours à 30°C.

**6.2.4. Analyse par PCR des clones recombinants et expression :** pour extraire l'ADN, les cellules sont reprises dans 300 µL d'eau stérile, bouillies pendant 10 min au microonde, et la PCR est effectuée sur 1 µL de cette solution. Pour exprimer la protéine, un des clones positifs a été mis en culture pendant trois jours à 30°C sous agitation et en présence de zéocine.

## **7. Extraction et purification de protéines recombinantes :**

### **7.1. Extrait cellulaire brut :**

Pour préparer les extraits cellulaires, contenant les protéines recombinantes solubles, les cellules d'une culture de 100 mL induite ont été récupérées par centrifugation. Le culot a été ensuite incubé avec 1 mg/mL de lysozyme pendant 30 min à 4°C dans un tampon 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 300 mM NaCl à pH 7,4. La suspension cellulaire est ensuite broyée par ultrasonication à l'aide d'un sonicateur (cycle 0,5, amplitude 70 % pour 3 fois 3 min), et la fraction soluble a été séparée par centrifugation à 10 000 x g pour 20 min.

### **7.2. Purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité :**

Toutes les protéines dans cette étude possèdent des étiquettes 6xHis à leur extrémité N-terminale ou C-terminale pour faciliter leur purification en utilisant la chromatographie d'affinité d'ion métallique. Dans le cas de l'ion Co<sup>2+</sup> (TALON Metal Affinity Resins, Clontech, USA), la résine est en solution, alors que dans le cas de l'ion Ni<sup>2+</sup>, elle est immobilisée soit par le TED (tris-carboxyméthyl éthylène diamine) soit par le NTA (*Nitriloacetic acid*) sur un gel de silice (colonnes Protino, Macherey-Nagel, France). La résine TED lie cinq des six liaisons des ions Ni<sup>2+</sup> ce qui laisse une liaison libre pour fixer l'histidine de l'étiquette des protéines recombinantes alors que la résine NTA laisse deux liaisons libres.

L'échantillon à purifier migre par gravité à travers la colonne de nickel, ou est incubé avec la résine de cobalt. Après lavage de la colonne, les protéines recombinantes immobilisées sont éluées avec une solution contenant 250 mM d'imidazole qui entre en compétition avec l'histidine des étiquettes protéiques.

Deux conditions de purification ont été utilisées, la purification en conditions natives et la purification en conditions dénaturantes. La différence entre ces deux conditions est l'addition d'urée (8 M) pour la purification en condition dénaturante. L'urée participe à la solubilisation des corps d'inclusion.

#### **7.2.1. En conditions natives :**

Les culots bactériens ont été suspendus dans un tampon A constitué de 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole et 1 mg/mL de lysozyme pour l'ATGL et la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis*, ou dans un tampon B constitué de 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5), 50 mM NaCl, 100 mM KCl, 30 mM imidazole, 1 mM DTT, 10 % glycérol pour la protéine CGI-58 murine. Ces tampons permettront à la fois la lyse des cellules, l'équilibration et le lavage de la colonne d'affinité. Durant la lyse, un inhibiteur de protéase (Roche, France) a été rajouté, la paroi a été ensuite cassée par sonication (cycle 0,5, amplitude 70 %) par 3 cycles de 3 min. On réalise ensuite une centrifugation à 10 000 x g à 4°C pendant 20 minutes. On obtient un surnageant avec la protéine soluble et un culot contenant, entre autres, la protéine insoluble se trouvant dans les corps d'inclusion.

Le surnageant ainsi obtenu a été ensuite chargé sur colonne de nickel ou incubé avec 1 mL de résine cobalt pour 3 h à 4°C, puis une étape de lavage est réalisée avec le même tampon de lyse, contenant dans certain cas de l'imidazole à une concentration de 25 mM (purification de la protéine CGI-58 de plante) ou 100 mM (purification de la protéine CGI-58 de souris) dans le but d'éliminer les contaminants. Finalement, l'élution a été effectuée avec le même tampon de lyse contenant 250 mM d'imidazole.

#### **7.2.2. En conditions dénaturantes :**

Le culot bactérien obtenu suite à la centrifugation de l'extrait brut est solubilisé dans le tampon A contenant de l'urée (8 M), puis centrifugé (5000 x g pendant 20 minutes) pour séparer les protéines solubilisées des débris cellulaires. La purification a été réalisée de la même façon que celle décrite pour les protéines solubles. Tous les tampons utilisés pour la purification de protéines en conditions dénaturantes contiennent en plus de l'urée 8M.

### **7.3. Chromatographie d'exclusion :**

Pour séparer les protéines d'intérêt, de l'imidazole et d'autres molécules, une chromatographie d'exclusion a été faite en utilisant la colonne PD10, GE Healthcare Life Science, Amersham, qui permet la séparation des molécules selon leur volume hydrodynamique. 2,5 mL de l'échantillon élué par chromatographie d'affinité, ont été donc chargés sur la colonne PD10, équilibrée préalablement soit par un tampon 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5), 10 % glycérol, pour le cas de l'ATGL, soit par un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8),

10 % glycérol, pour la protéine CGI-58. Ensuite, l'élution a été réalisée avec 3,5 mL du même tampon qu'utilisé pour équilibrer la colonne.

#### **7.4. Purification de protéines recombinantes par chromatographie échangeuse d'anions :**

La chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sepharose® CL-6B (diéthylaminoéthyl couplé par une liaison covalente à un polysaccharide) de chez Sigma-Aldrich®, a aussi été utilisée pour la purification des protéines. Cette chromatographie est fondée sur la différence du point isoélectrique (pI) des protéines à séparer. En utilisant un tampon d'un pH supérieur au pI de la protéine d'intérêt, celle-ci sera donc chargée négativement et devrait s'accrocher sur la colonne de DEAE chargée positivement, ensuite l'élution se fait par un gradient décroissant de pH jusqu'à éluer la protéine d'intérêt à un pH donné.

### **8. Analyse de l'expression et de la purification de protéines recombinantes :**

#### **8.1. Dosage des protéines :**

Les protéines sont dosées d'après la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique utilisant le bleu de Coomassie qui a la propriété de se lier aux résidus basiques et hydrophobes, induisant un déplacement du maximum d'absorption de 465 à 595 nm. La valeur d'absorbance obtenue est proportionnelle à la concentration de protéines présentes dans la solution, qui sera calculée grâce à une gamme étalon effectuée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA), dans les mêmes conditions expérimentales, en utilisant des plaques de 96 puits ; la lecture d'absorbance à 595 nm s'effectue sur spectrophotomètre TECAN M200.

Alternativement, la concentration des protéines est estimée en mesurant l'absorbance à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop, Thermo Fisher Scientific.

#### **8.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes :**

L'électrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide (Laemmli, 1970) en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) permet de séparer des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Le gel est créé par polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. En se liant aux protéines, le SDS dénature les protéines et leur confère une charge nette négative. Ceci permet sa migration dans la matrice sous l'effet d'un courant électrique, et la séparation des protéines s'effectue en fonction uniquement de leur masse moléculaire.

Pour l'analyse des protéines totales (contenues dans les cellules), un culot bactérien correspondant à un équivalent de 100 µl de culture d'une  $DO_{600nm}$  de 1 a été analysé sur SDS PAGE, alors que pour les fractions purifiées 1 à 5 µg de protéine ont été analysés. Les échantillons protéiques sont tout d'abord suspendus dans le tampon de charge (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), glycérol 25 %, SDS 2 %, Bleu de bromophénol 0,01 % et  $\beta$ -mercaptoethanol 10 mM), puis dénaturés à 100°C pendant 5 min, ensuite les protéines sont concentrées dans un gel de concentration à 4 % d'acrylamide pour 20 min à 90 V puis séparées dans un gel de

séparation à 12 % d'acrylamide pour 2 h à 120 V. Après migration, le gel est incubé 1 h ou une nuit dans une solution «EZblue, Sigma» ou de bleu de Coomassie. Le gel est ensuite décoloré soit à l'eau pour la solution EZblue soit par une solution d'éthanol 10 % (v/v) et acide acétique 7 % (v/v) pour le bleu de Coomassie.

### **8.3. Transfert des protéines sur membrane et révélation par immunoempreinte :**

Les protéines de l'échantillon sont séparées dans un premier temps selon leur taille par gel SDS-PAGE, puis transférées depuis ce gel sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène Fluoride) à l'aide d'un courant électrique de 100 V pour 1 h dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine et 20 % d'éthanol). Le PVDF lie les protéines d'une manière non-spécifique, grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé en plongeant la membrane dans une solution diluée de protéines de lait (5 %) dans un tampon TBS-Tween (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 0.1 % Tween à pH 7,2) pendant une heure. La détection, après trois lavages de 15 min avec le tampon TBS-Tween, a été faite par des anticorps monoclonaux anti poly-histidines (de chez Sigma Aldrich Chimie), ces anticorps sont couplés à la peroxydase, et la révélation est faite en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de DAB (3,3'-Diaminobenzidine), un précipité brun est alors directement observé.

### **8.4. Spectrométrie de masse :**

Pour vérifier l'identité de protéines purifiées, une analyse par spectrométrie de masse suite à une digestion par la trypsine a été réalisée par le centre d'analyses protéomiques IMM-CNRS, Marseille, France.

## **9. Activités enzymatiques :**

L'activité LPAAT a été mesurée en présence de 50  $\mu\text{M}$  de lysoPA et 10  $\mu\text{M}$  d'oléoylCoA radiomarké (13 000 dpm / test) dans un tampon potassium phosphate 50 mM (pH 7) pour 10 min, pour 1  $\mu\text{g}$  de protéine, dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$ .

L'activité phospholipase a été mesurée en présence de 100  $\mu\text{M}$  de dipalmitoyl-PC radiomarkée (20 000 dpm / test), dans un tampon Tris HCl 50 mM (pH 7,5) pour 40 min, en présence de 2 mM DTT et de 1  $\mu\text{g}$  de protéine dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$  ; le mélange réactionnel a été soumis à des ultrasons pendant 5 min avant l'ajout de l'enzyme.

L'activité TG lipase a été mesurée en présence de 100  $\mu\text{M}$  de trioléine radiomarkée (100 000 dpm / test) et 100  $\mu\text{M}$  de taurocholate de sodium dans un tampon Tris HCl 50 mM (pH 7,5) pour 40 min, en présence de 1  $\mu\text{g}$  de protéine dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$  ; le mélange réactionnel a été soumis à des ultrasons pendant 5 min avant l'ajout de l'enzyme.

Tous ces tests enzymatiques ont été réalisés à une température de 32°C, et la réaction a été arrêtée en ajoutant 100  $\mu\text{L}$  de 0,1 N HCl. Ensuite, les lipides ont été extraits en utilisant un mélange de chloroforme:méthanol (2:1, v/v), et en ajoutant comme entraîneur les substrats et produits attendus non radiomarkés. Les extraits lipidiques ont été ensuite séparés par CCM, sur plaque de silice (Silica Gel G & GF Preparative Uniplates) ; les systèmes de séparation

utilisés pour chaque CCM sont les suivants : pour l'activité LPAAT, chloroforme / méthanol / acétone / acide acétique / eau (50/10/20/15/5), pour l'activité lipase, heptane / diéthyl éther / acide acétique (55 / 45 / 1), et pour l'activité phospholipase, chloroforme / méthanol / eau / acide acétique (65 / 24 / 4 / 1). La région contenant le produit de la réaction a été grattée de la plaque de silice et quantifiée par comptage à scintillation.

Le dipalmitoyl-PG (DPPG) a été synthétisé par transphosphatidylation à partir de la [ $^{14}\text{C}$ ]-DPPC, en utilisant la phospholipase D (PLD) et en présence de glycérol comme accepteur du groupement phosphatidyle. La DPPC (35,3 nmol) non radiomarkée a été mélangée avec 4,5 nmol de [ $^{14}\text{C}$ ]-DPPC puis soumise aux ultrasons pendant 10 min dans 150  $\mu\text{L}$  de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8) contenant du SDS à 0,83 mM, du Triton X100 à 0,83 mM, du  $\text{CaCl}_2$  à 20 mM, et du glycérol à 500 mM. La PLD de *Vigna unguiculata* purifiée (200 ng) est ensuite rajoutée dans le milieu réactionnel pour 1 h à 30°C. 100  $\mu\text{L}$  d'HCl 0,1 N a été rajouté pour arrêter la réaction, et les lipides ont été extraits en utilisant du chloroforme:méthanol (2:1, v/v) et séparés par CCM en utilisant une solution de chloroforme:méthanol:acide acétique (65:25:10, v/v/v). Le [ $^{14}\text{C}$ ]-DPPG a été gratté de la plaque de silice, re-dissout dans du chloroforme:méthanol (2:1, v/v), filtré et conservé à -20°C. L'activité spécifique du DPPG radiomarké synthétisé a été calculée à 250 dpm / pmol.

L'activité PG acylhydrolase de la protéine CGI-58 a été testée en utilisant la protéine recombinante purifiée ou un extrait cellulaire d'*E. coli* exprimant la protéine. Du DOPG (10 nmol) non radiomarké a été mélangé avec 20 pmol de [ $^{14}\text{C}$ ]-DPPG (250 dpm / pmol) puis soumis aux ultrasons pendant 5 min dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Ensuite, 7  $\mu\text{g}$  de protéine purifiée ou 10  $\mu\text{g}$  d'extrait protéique total ont été rajoutés, et la réaction a été conduite à 30°C pour 2 h pour la protéine purifiée et 30 min pour l'extrait cellulaire. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de HCl 0,1 N, et les lipides ont été extraits en utilisant un mélange chloroforme:méthanol (2:1, v/v) puis séparés par CCM en utilisant une solution de chloroforme:méthanol:acide acétique (65:25:10, v/v/v). La région contenant l'acide gras libre a été grattée de la plaque de silice et quantifiée par comptage à scintillation.

L'activité estérasique de la protéine AtCGI-58 a été testée aussi en utilisant un substrat chromogénique, le 4-nitrophényl palmitate (4-NPP). Cette méthode repose sur la détection du groupe chromophore (4-nitrophénol) qui est libéré lors de l'hydrolyse de cet ester de 4-nitrophényle (incolore). Le produit libéré, le 4-nitrophénol (jaune) est détecté par spectrophotométrie à 415 nm à différents intervalles de temps, ce qui permet de faire une cinétique de réaction, de plus cette technique est plus sensible qu'une détection par CCM. Pour ce test, la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* a été incubée avec le 4-NPP pour 30 min à 37°C, et l'absorbance à 415 nm a été mesurée toutes les minutes.

Pour le test chromogénique de l'activité lipasique de l'ATGL, des liposomes de MG couplé au nitrobenzofurazan (NBD-MG), de PC et de PI ont été obtenus en mélangeant les trois substrats à 150  $\mu\text{M}$ , 29  $\mu\text{M}$  et 13  $\mu\text{M}$  respectivement dans un tampon Tris 25 mM pH 7,4 et NaCl 150 mM, puis en les soniquant pour 3 cycles d'une minute à 4°C ; dans ces conditions le substrat change de couleur passant du jaune au rose-rouge, ce qui montre la



bonne formation des liposomes. L'ATGL seule (20 µg) ou en présence de la protéine CGI-58 (10 ou 20 µg) a été incubée avec le substrat pour 20 min à 37°C avec agitation et la réaction a été suivie en mesurant l'absorbance toutes les 30 secondes à 481 nm. La TLL (2 et 5 µg) a été utilisée comme contrôle positif.

## 10. Mutagenèse dirigée :

Les mutants de la protéine CGI-58 ont été générés par mutagenèse dirigée en utilisant le kit GeneArt® Site-Directed Mutagenesis PLUS d'Invitrogen.

Les mutations ont été introduites par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour chaque mutant (**Tableau S1**), avec l'aide de l'AccuPrime™ Pfx polymérase (**cf. II.1**). La réaction de PCR contient 5 ng de plasmide avec 4 U/µL d'ADN méthylase, un "enhancer" de PCR, de la S-adénosylméthionine (SAM) à 1 mM, le tout dans le tampon spécifique pour la Pfx dans un volume final de 12,5 µL. La PCR a été vérifiée sur gel agarose 0,8 %. Ensuite 1 µL du milieu de PCR a été incubé avec la recombinaise, dans son tampon, dans un volume final de 5 µL pour 10 min à température ambiante. La réaction de recombinaison a été arrêtée par l'ajout de 25 mM d'EDTA. Par la suite, 0,4 µL de la réaction de recombinaison a été transformé dans 10 µL de cellules DH5α™-T1R chimiocompétentes (**cf. I.2.1**), par choc thermique à 42°C pour 30 sec. Les cellules transformées ont été ensuite étalées sur boîte LB-agar avec de la Kanamycine et incubées pour la nuit à 37°C.

Les clones transformés ont été criblés par PCR pour la présence des polyinsertions, et l'ADN plasmidique a été ensuite purifié et séquencé pour vérifier la présence de la bonne mutation.

## 11. Extraction et analyse des lipides par chromatographie sur couche mince :

L'extraction des lipides a été effectuée en utilisant la méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959), modifiée par Ames (Ames, 1968). Une culture d'*E. coli* (25 mL), induite pendant 4 h par l'IPTG, exprimant ou pas la protéine d'intérêt, a été centrifugée à 4000 x g pour 10 min, le culot a été resuspendu dans 0,8 mL de tampon PBS, 2 mL de méthanol et 1 mL de chloroforme ont été rajoutés, et le mélange a été conservé à température ambiante pour 1 h. Ensuite, 1 mL de PBS et 1 mL de chloroforme ont été rajoutés, et une centrifugation à 800 x g pour 5 min a été faite pour séparer la phase aqueuse de la phase organique, qui a été récupérée et séchée sous azote, puis reprise dans 50 µL de chloroforme et déposée sur plaque de CCM (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey Nagel)).

Une migration en deux dimensions a été réalisée en utilisant une solution de chloroforme / méthanol / eau (65:25:4, v/v/v) pour le premier sens, et une solution chloroforme / méthanol / acide acétique (65:25:10, v/v/v) pour le second. Les lipides ont été révélés ensuite par exposition à l'iode.

## 12. Quantification des lipides :

Le PG et la PE des extraits lipidique d'*E. coli* ont été quantifiés par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS). Les lipides totaux

extraits comme expliqué dans la partie précédente (**cf. II.11**) ont été resuspendus dans 2,5 mL de méthanol. Par la suite, un aliquot de 200 µL de chaque échantillon a été filtré et séché sous azote et resuspendu dans 200 µL d'acétonitrile / méthanol / chloroforme (18:1:1, v/v/v), et 10 µL de ce mélange ont été injectés dans la colonne pour analyse.

Le système de LC est composé de deux pompes binaires LC-30AD, d'un échantillonneur automatique SIL-30AC et d'un four de colonne CTO-20AC (Shimadzu). Les échantillons ont été séparés sur une colonne CORTECS HILIC de 2,7 µm 4,6x150 mm de chez Waters.

Le gradient d'élution utilisé contient deux solutions, A et B ; A est composée de 95/5 (v/v) d'acétonitrile/eau avec 10 mM ammonium formate, et B de 50/50 (v/v) d'acétonitrile/eau avec 10 mM ammonium formate. La colonne a été équilibrée pour 2 min avec 0 % de B avant l'injection des échantillons. Ensuite le pourcentage de B a été maintenu à 0 % pour 2 min, puis a été augmenté de 0 à 50 % pendant 8 min. Le débit était de 0,5 mL/min et la température de la colonne de 30°C.

Pour la spectrométrie de masse, le système QTRAP 4500, équipé d'une source ESI (ABSciex), a été utilisé en mode positif. L'azote a été utilisé comme gaz enveloppe à une pression de 40 psi. La tension de pulvérisateur a été réglée à 4500 V et la température de vaporisation était de 350°C.

L'analyse par MS/MS consistait à la recherche en la perte d'une molécule de 189 Da pour le PG et de 141 Da pour la PE. La gamme de masse balayée était de 600 à 1000 m/z pour le PG et la PE, et la vitesse de balayage était de 1000 Da/s pour chaque expérience. Le potentiel de désintégration a été réglé à 95, le potentiel d'entrée à 10, l'énergie de collision à 37, et le potentiel de sortie à 13. La quantité de PG et PE a été calculée en se basant sur deux gammes étalon de standard, de 28:0 PG et de 36:2 PE respectivement. Ces analyses ont été effectuées sur la plateforme lipidomique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL) à Villeurbanne.

### **13. Analyses statistiques :**

Les données graphiques ont été représentées comme moyenne de triplicat ± déviation standard. Le test statistique de Student (unpaired t-test two-tailed) a été utilisé pour déterminer si les données statistiques sont différemment significatives. Les valeurs ont été considérées comme significativement différentes si  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*), et  $P < 0.001$  (\*\*\*)

# RESULTATS ET DISCUSSION

---

## I. Comparative Gene Identification-58 ou CGI-58

La protéine CGI-58 identifiée comme cofacteur de l'ATGL (Lass *et al.*, 2006) et responsable, lorsqu'elle est mutée de la maladie de CDS (Lefevre *et al.*, 2001), a été le sujet d'un vaste débat sur son rôle biologique, dans le métabolisme lipidique et dans la perméabilité membranaire, en plus de son rôle comme activateur de l'ATGL.

En fait, les protéines CGI-58 murine et d'*Arabidopsis thaliana* ont été décrites jusqu'à l'année 2014 comme ayant une activité acide lysophosphatidique acyl-CoA acyltransférase ou LPAAT, suite aux études faites par deux équipes, Brasaemle *et al.* (Montero-Moran *et al.*, 2010) sur la protéine murine, et Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009) sur celle d'*Arabidopsis*. Cette activité rapportée a été expliquée, notamment, par la présence du motif HX<sub>4</sub>D, dans la partie C-terminale de la protéine CGI-58, ce motif étant important pour une activité acyltransférase (Bayer *et al.* 2004).

En plus de cette activité LPAAT, Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009) ont rapporté une activité lipase et une activité phospholipase pour la protéine AtCGI-58, vu que cette dernière possède la triade catalytique Ser-Asp/Glu-His comme celle trouvée chez les lipases. De telles activités lipase et phospholipase n'ont été pas rapportées pour la protéine murine, vu que la sérine potentiellement catalytique dans cette version de la protéine est remplacée par une asparagine.

C'est alors qu'au milieu de l'année 2014, la même équipe Brasaemle *et al.* (McMahon *et al.*, 2014), suite à des études de mutagenèse dirigée, a publié que l'activité LPAAT décrite pour la protéine CGI-58 murine n'était en fait qu'un artefact dû à la présence d'un contaminant dans la purification de la protéine recombinante réalisée à partir d'*E. coli*.

De plus, et dans la même année, une autre équipe (Zhang *et al.*, 2014) a rapporté une activité LPGAT (lysophosphatidylglycérol acyl-CoA acyltransférase) pour la protéine CGI-58 murine, en confirmant en même temps une activité LPAAT pour cette protéine. Dans cette étude, l'équipe a utilisé une autre technique de purification de la protéine, employant des cellules de mammifères et d'insectes.

Au début de cette thèse, en 2012, l'objectif principal était de caractériser les interactions de la protéine CGI-58 et de l'ATGL pour essayer de comprendre son mécanisme d'activation, notamment par des mesures de cinétiques interfaciales, afin de discriminer les zones d'interaction. L'activation de l'ATGL de mammifères par la protéine CGI-58 de plantes était aussi une expérience à tenter. Les premiers temps de thèse furent donc consacrés à la purification des protéines recombinantes, guidée par les protocoles publiés par Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009) et par Montero-Moran *et al.* (Montero-Moran *et al.*, 2010).

Au vu des différents résultats de (McMahon *et al.*, 2014) et (Zhang *et al.*, 2014), ainsi que nos propres résultats obtenus pendant les deux premières années de thèse, nous avons donc voulu aussi (re)vérifier la présence ou l'absence des activités LPAAT et LPGAT pour les deux protéines CGI-58, celle de souris et celle d'*Arabidopsis* en utilisant des techniques biochimiques *in vivo* et *in vitro*; de plus, vu que Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009) avaient décrit une purification de la protéine recombinante d'*Arabidopsis* à partir d'*E. coli*, ceci permet de se poser la question si l'activité LPAAT observée n'était pas due aussi à la même source de contamination, la même suspicion pouvait aussi être émise à propos des activités lipase et phospholipase décrites pour la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis*.

Cette étude a donc été réalisée en deux grandes parties, une partie *in vitro* où l'on avait besoin de la protéine purifiée pour tester différentes activités enzymatiques, et l'autre partie *in vivo* où l'on a créé des systèmes qui permettaient le criblage des différentes activités.

## **1. Tentatives de purification de la protéine MmCGI-58 :**

Dans le but d'étudier la protéine CGI-58 murine, des constructions ont été réalisées en utilisant le plasmide pET28b(+) qui permet l'expression dans les bactéries *E. coli* de la protéine recombinante par induction avec l'IPTG.

### **1.1. Expression dans *E. coli* (souche BL21(DE3)) de la protéine MmCGI-58 :**

Dans une tentative d'expression afin d'obtenir une protéine pure, l'ADNc codant la protéine MmCGI-58 a été transformé dans le système procaryotique, *E. coli*, en utilisant le vecteur d'expression pET28b(+) ; ce système, connu pour sa rapidité et sa simplicité, était le meilleur choix pour un premier essai. Trois constructions différentes ont été réalisées dans le vecteur pET28b(+) : une avec une étiquette 6xHis du côté N-terminal, une autre avec la même étiquette mais du côté C-terminal, et la troisième sans étiquette. L'étiquette poly-histidines permettra par la suite la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité.

#### **1.1.1. Construction des plasmides :**

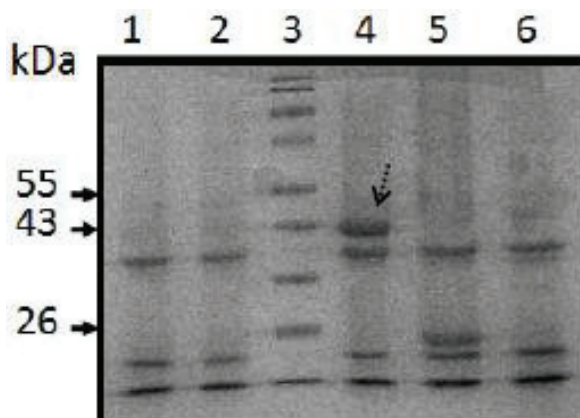
Les trois constructions avaient été réalisées avant mon arrivée au laboratoire par Assia Bentebibel.

#### **1.1.2. Transformation dans *E. coli* et expression :**

Les trois constructions pET28b-MmCGI-58 (avec ou sans étiquette 6xHis) ont été transférées dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli* par électroporation (voir Matériel et Méthodes).

L'expression de la protéine CGI-58 suite à une induction par l'IPTG a été analysée par SDS-PAGE des protéines issues de cellules entières (extrait protéique total) (**Figure 37**). A partir du gel, on a pu conclure que seule la protéine CGI-58 avec l'étiquette en N-terminal était exprimée (**Figure 37, piste 4**), une bande protéique à environ 45 kDa étant observable

(indiquée par une flèche) ; pour les autres constructions (C-terminal : piste 1, et sans étiquette : piste 2) la protéine CGI-58 n'était pas visible sur gel.



**Figure 37 :** Analyse par SDS-PAGE des extraits protéiques totaux issus de cellules transformées par les trois constructions pET28b-*MmCGI-58*. Seule la protéine CGI-58 étiquetée en N-terminal a été exprimée (piste 4 bande au niveau de 45 kDa, flèche). **Piste 1 :** CGI-58 sans étiquette ; **piste 2 :** CGI-58 étiquetée en C-terminal ; **piste 3 :** marqueur de masse moléculaire ; **piste 4 :** CGI-58 étiquetée en N-terminal ; **piste 5 :** protéine SDR de 26 kDa, contrôle positif d'induction ; **piste 6 :** vecteur vide. La flèche pointillée indique la protéine CGI-58.

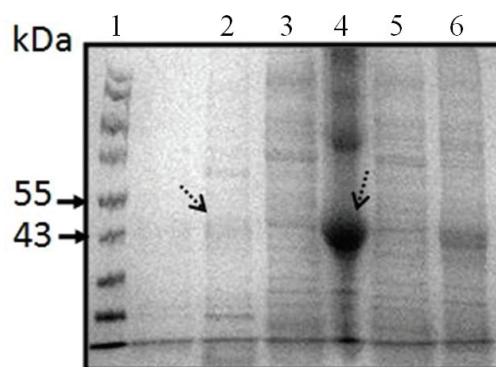
Ces résultats (expression uniquement de la protéine étiquetée en N-terminal) peuvent s'expliquer par des structures secondaires au niveau de l'ARNm bloquant le passage de la machinerie ribosomale, structures qui seraient déstabilisées par la séquence N-terminale ajoutée.

### 1.1.3. Purification de la protéine *MmCGI-58* étiquetée par 6xHis en N-terminal :

#### 1.1.3.1. Purification en conditions natives :

Pour la purification de la protéine CGI-58, une culture de 1 L a été entreprise pour la construction étiquetée en N-terminal, les cellules induites ont été cassées par sonication et ensuite l'extrait cellulaire a été purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel en conditions natives, ce qui permet de purifier les protéines solubles, en conformation native, potentiellement actives et donc non dénaturées. La colonne chargée avec l'extrait de la fraction protéique soluble a ensuite été lavée avec un tampon ne contenant pas d'imidazole et l'élution a été réalisée avec une concentration de 250 mM d'imidazole.

Après cette étape de purification l'éluat final, ainsi que d'autres échantillons, ont été analysés par SDS-PAGE (**Figure 38**). La protéine CGI-58 était présente dans la fraction soluble (**Figure 38, piste 5**) en une très faible quantité et la plus grande partie de la protéine CGI-58 est restée dans le culot constitué entre autres de corps d'inclusions (**Figure 38, piste 4**). On a remarqué que la fraction non liée (**Figure 38, piste 3**) a la même composition que la fraction soluble indiquant une très faible quantité de protéine CGI-58 qui a été retenue par la résine qu'on voit ensuite dans la fraction éluée (**Figure 38, piste 2**).



**Figure 38 :** Analyse par SDS-PAGE des fractions issues de la purification en conditions natives de la protéine *Mm*CGI-58 étiquetée en N-terminal. On peut y voir la bande de 45 kDa qui correspond à la protéine CGI-58 dans l'éluat final (piste 5, flèche), la plupart de la protéine étant dans des corps d'inclusion (piste 3). **Piste 1 :** marqueur de masse moléculaire ; **piste 2 :** éluat ; **piste 3 :** fraction non liée ; **piste 4 :** culot protéique après sonication et centrifugation (fraction insoluble) ; **piste 5 :** surnageant protéique après sonication et centrifugation (fraction soluble) ; **piste 6 :** Extraits protéiques après sonication et avant centrifugation. Les flèches pointillées indiquent la présence de la protéine CGI-58.

En fait, la protéine CGI-58 est une protéine associée aux LD dans le tissu adipeux, et donc elle se trouve dans des conditions potentiellement hydrophobes, ce qui peut rendre difficile son obtention dans la fraction soluble du milieu intracellulaire, et par conséquent conduirait à son accumulation, en grande partie, dans les corps d'inclusion. Il est donc possible que la protéine interagisse avec les membranes plasmiques dans ce système, expliquant sa faible présence dans la fraction soluble et sa forte présence dans la fraction insoluble (fraction membranaire et/ou corps d'inclusion).

Dans ces conditions, le rendement et la pureté de l'échantillon purifié étaient très faibles, d'autres techniques, conditions et optimisations ont alors été utilisées.

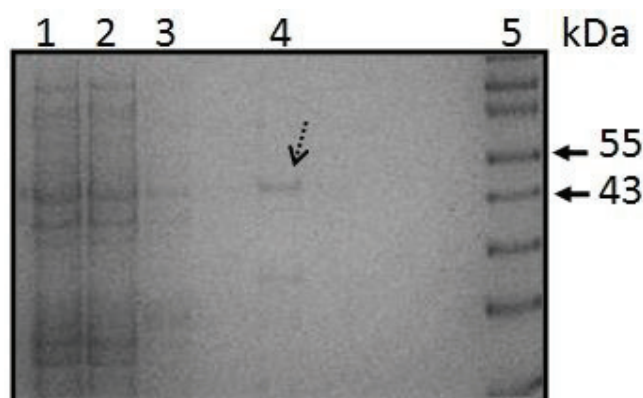
### 1.1.3.2. Purification en conditions dénaturantes :

Vu que la quasi-totalité de la protéine CGI-58 était dans les corps d'inclusion, une purification en conditions dénaturantes a été entreprise. Le culot cellulaire, d'une fraction issue de la culture d'1 L, a été mélangé avec une solution contenant de l'urée 8 M, et les corps d'inclusion sont ainsi solubilisés. Une étape de centrifugation pour éliminer les différents débris cellulaires, suivie par une chromatographie d'affinité sur colonne de nickel de la fraction ainsi solubilisée, ont été réalisées. Le résultat de cette purification a été analysé sur SDS-PAGE (**Figure 39**).

La protéine CGI-58 a bien été purifiée dans ces conditions (**Figure 39, piste 4**), mais en présence d'une concentration d'urée 8M, et donc dénaturée et inactive. Une étape d'élimination de l'urée pour la renaturer est donc nécessaire, pour qu'on puisse tester son activité et son effet potentiel d'activateur de l'ATGL. Toutefois, ces résultats confirment bien la présence d'une étiquette 6-His sur cette protéine, il n'y a pas de clivage de l'étiquette rendant une purification en conditions natives impossible. Toutefois, vu la présence d'une fraction de la protéine CGI-58 dans la partie native soluble, et les difficultés et contraintes que l'on pourrait avoir dans les tests de renaturation de la protéine à partir d'une concentration initiale d'urée de 8 M, d'autres systèmes et conditions, beaucoup plus rapides et efficaces, ont



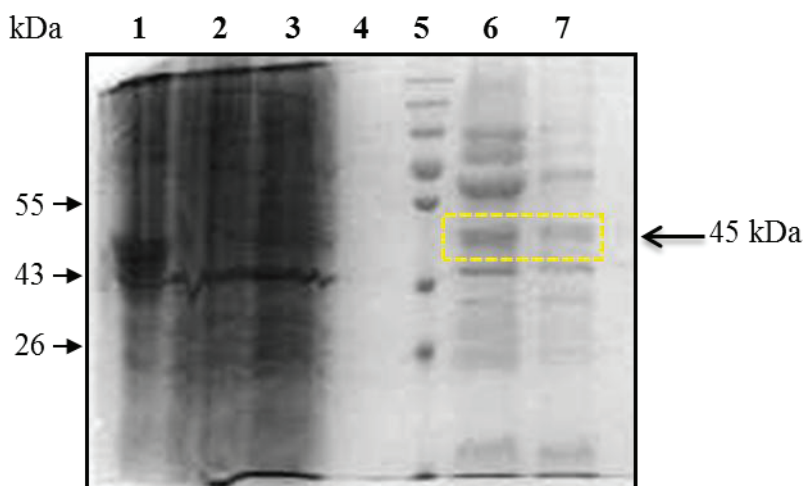
été testés pour la purification de la protéine native contenant dans la fraction soluble non dénaturée, avant d'envisager de tester la renaturation de la protéine.



**Figure 39 :** Analyse par SDS-PAGE de la purification dans des conditions dénaturantes de la protéine *MmCGI-58* étiquetée en N-terminal. Une bande protéique d'environ 45 kDa est observable dans l'éluat final (piste 4, flèche). **Piste 1 :** fraction après centrifugation ; **piste 2 :** fraction non liée ; **piste 3 :** fraction de lavage ; **piste 4 :** éluat ; **piste 5 :** marqueur de masse moléculaire. La flèche pointillée indique la protéine CGI-58.

### 1.1.3.3. Optimisation de la purification en conditions natives :

Dans un premier temps, et vu qu'une très faible quantité de la protéine CGI-58 a été accrochée sur la résine de nickel, on a essayé d'augmenter la quantité initiale de culture cellulaire à purifier, pour augmenter la quantité de protéine CGI-58 dans la fraction soluble. Les protéines de cellules obtenues à partir de 2 L de culture, après induction, ont été purifiées dans les mêmes conditions natives que précédemment (c.f. 1.1.3.1). Le résultat de cette purification a été analysé par SDS-PAGE (**Figure 40**).

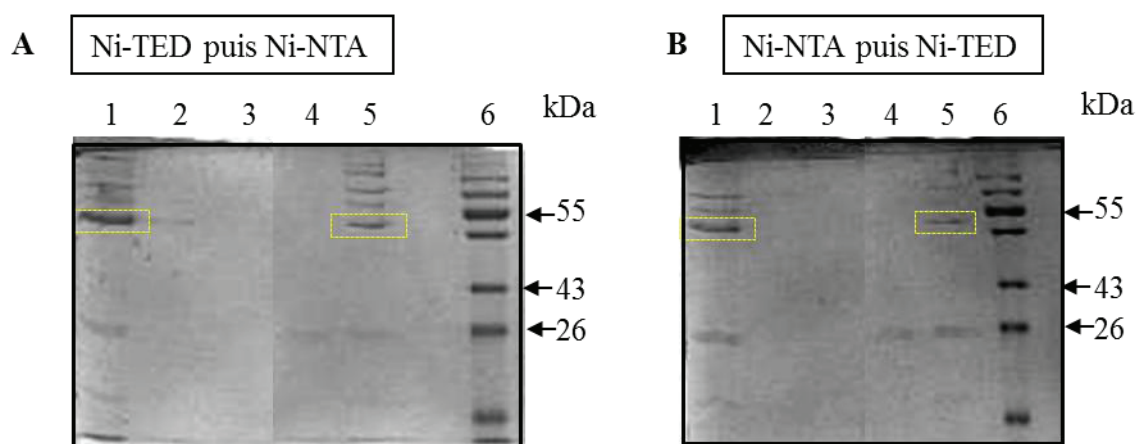


**Figure 40 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée en N-terminal. Une bande protéique d'environ 45 kDa qui correspond à la protéine CGI-58 est observable dans l'éluat final (piste 6 et 7). **Piste 1 :** fraction insoluble ; **piste 2 :** fraction soluble ; **piste 3 :** fraction non liée ; **piste 4 :** fraction de lavage ; **piste 5 :** marqueur de masse moléculaire ; **piste 6 :** 1<sup>ère</sup> fraction d'éluat ; et **piste 7 :** 2<sup>ème</sup> fraction d'éluat. Le cadre jaune indique la protéine CGI-58.

Dans ces conditions, on a donc réussi à avoir une fraction plus enrichie en protéine CGI-58 que lors de la précédente tentative, mais la pureté de l'échantillon n'était toutefois pas encore suffisante, pour cela d'autres optimisations ont donc été effectuées.

Afin d'améliorer la pureté des échantillons purifiés, une purification sur colonne de chromatographie d'affinité a été réalisée en deux étapes, en utilisant successivement et alternativement deux types de colonnes de nickel : Ni-TED et Ni-NTA. La différence entre ces deux colonnes est le nombre de liaisons libres pour interagir avec l'étiquette 6xHis : une liaison pour la colonne Ni-TED, et trois liaisons pour la colonne Ni-NTA. Il faut mentionner que les échantillons élués de la première colonne ont été dialysés contre le même tampon d'élution mais sans imidazole avant de faire la deuxième purification.

Comparée à une purification en une seule étape, en sortie de la seconde colonne (qu'elle soit de type Ni-TED ou Ni-NTA), la pureté de l'échantillon n'a pas été vraiment améliorée (**Figure 41**).



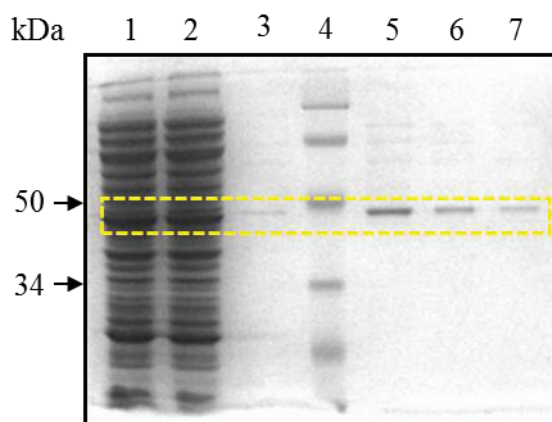
**Figure 41** : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée en N-terminal en utilisant successivement deux colonnes de nickel (TED et NTA). **A** : Ni-TED puis Ni-NTA et **B** : Ni-NTA puis Ni-TED. **Piste 1** : éluat issue de la 1<sup>ère</sup> colonne après dialyse (celui qui sera chargé sur la deuxième colonne) ; **piste 2** : fraction non liée de la deuxième colonne ; **piste 3** : fraction de lavage de la deuxième colonne ; **pistes 4 et 5** : fractions d'élution ; **piste 6** : marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la protéine CGI-58.

#### 1.1.4. Purification de la protéine *MmCGI-58* étiquetée par 12xHis en N-terminal :

##### 1.1.4.1. Purification en conditions natives sur colonne de cobalt :

Avant les essais d'optimisation, Brasaemle *et al.* avaient publié un article (Montero-Moran *et al.*, 2010), où ils présentaient un protocole de purification de la protéine *MmCGI-58*, en utilisant une construction étiquetée par 12xHis en N-terminal, par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Ni-NTA). A part la différence de la taille de l'étiquette comparée à notre construction, dans leur protocole ces auteurs ont extensivement lavé la résine, avant l'étape d'élution, par le tampon contenant 20 mM d'imidazole. En effet, dans nos essais d'optimisation, un lavage avec un gradient d'imidazole avait été envisagé, c'est pour cela que l'on a contacté l'équipe américaine pour leur demander plus de renseignements. Ils nous ont donc envoyé leur plasmide et un protocole, autre que celui publié, en disant que celui-ci était encore "plus optimisé" ; dans ce protocole, une résine de cobalt au lieu de nickel est utilisée, et la purification se déroule à partir de cellules issues de 4 L de culture, et un lavage de la colonne avant élution est réalisé avec un tampon contenant 100 mM d'imidazole.

En utilisant la construction et le protocole expérimental qui nous ont été fournis, j'ai réussi à purifier la protéine *MmCGI-58* sans contaminant (**Figure 42**), mais avec un très faible rendement : environ 12 µg de protéine purifiée par litre de culture.

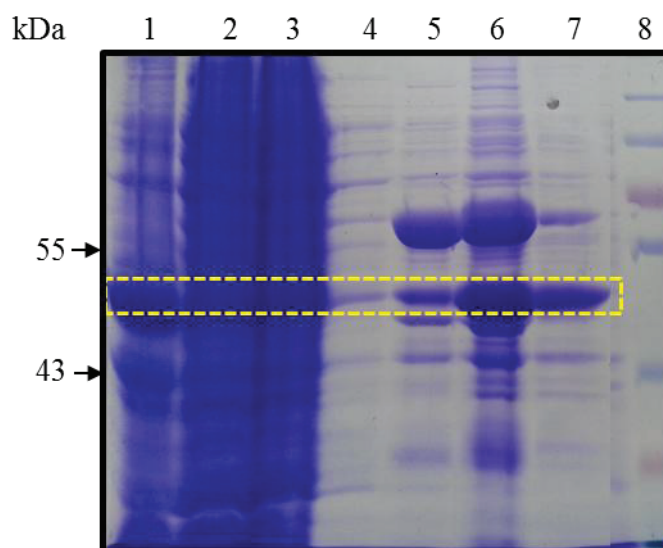


**Figure 42** : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée 12xHis en N-terminal en utilisant une colonne de cobalt. On remarque une meilleure pureté de l'éluat (pistes 5, 6 et 7) mais une partie de la protéine CGI-58 est perdue dans le lavage (piste 3). **Piste 1** : fraction soluble ; **piste 2** : fraction non liée ; **piste 3** : fraction de lavage par le tampon contenant 100 mM d'imidazole ; **piste 4** : marqueur de masse moléculaire ; **pistes 5, 6 et 7** : fractions éluées. Le cadre jaune indique la protéine CGI-58.

#### 1.1.4.2. Purification en conditions natives sur colonne de nickel :

Au vu de ces résultats, en émettant l'hypothèse que peut-être la présence de l'étiquette 12 histidines favorise l'interaction spécifique, et dans le but d'améliorer le rendement de la purification, nous avons donc décidé d'utiliser la construction étiquetée 12xHis en utilisant le protocole optimisé en laboratoire, avec une purification en une seule étape sur une colonne de nickel. Cette fois-ci, la protéine CGI-58 murine a été purifiée à partir de 4 L de culture, ce qui augmente la quantité de la protéine CGI-58 soluble et donc augmente les protéines ayant une interaction spécifique avec la résine, et élimine des interactions non spécifiques, entre la résine et les contaminants. De plus, le volume de lavage utilisé a été multiplié par 5 par rapport à celui utilisé dans les premiers tests de purification. Dans ces conditions, la pureté de l'échantillon final a été bien améliorée par rapport à la précédente purification sur colonne de nickel. Mais l'analyse sur le gel SDS-PAGE montre deux bandes protéiques majoritaires, une qui correspond à la protéine CGI-58 (~45 kDa) et l'autre correspondant à un contaminant (~60 kDa) (**Figure 43, piste 7**).

En utilisant ce protocole, environ 0,15 mg de protéine ont pu être obtenus par litre de culture. Cette quantité est beaucoup plus élevée que celle obtenue (12 µg/L) en utilisant le protocole de Brasaemle *et al.* (Montero-Moran *et al.*, 2010). Mais la présence de ce contaminant faisant à peu près 60 kDa, qui sort toujours avec la protéine CGI-58 en utilisant ces conditions de purification, pourrait être gênante lors des tests enzymatiques pour mesurer l'activité biologique de la protéine, dans la mesure où d'autres équipes avaient pu atteindre un plus grand degré de pureté, voire une protéine purifiée à homogénéité sur gel SDS-PAGE.

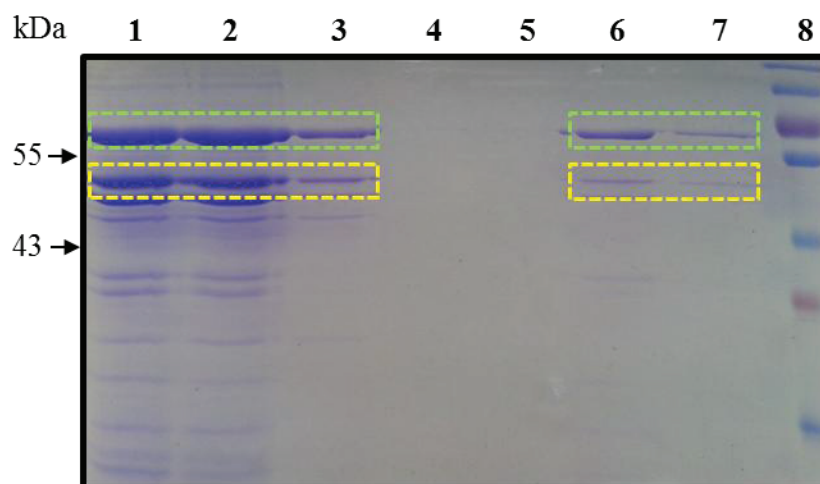


**Figure 43 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée 12xHis en N-terminal en utilisant la colonne de nickel. On remarque un meilleur enrichissement de la protéine CGI-58 (piste 7). **Piste 1 :** fraction insoluble ; **piste 2 :** fraction soluble ; **piste 3 :** fraction non liée ; **piste 4 :** fraction de lavage ; **piste 5, 6 et 7 :** éluats successifs ; **piste 8 :** marqueur de masse moléculaire ; le cadre jaune indique la protéine CGI-58.

La nature de la protéine 60 kDa a été déterminée par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, et correspond à la protéine GroEL d'*E. coli* qui appartient à la famille des chaperonines (Braig *et al.* 1994). En même temps, la bande protéique de 45 kDa a été vérifiée et confirmée par la même technique comme étant la protéine CGI-58 (voir Annexe 3).

#### 1.1.4.3. Optimisation de la purification en conditions natives sur colonne de nickel :

En connaissant l'identité de ce contaminant et ses propriétés biochimiques, on a essayé par la suite d'optimiser le protocole de la purification effectué précédemment pour séparer les deux protéines CGI-58 et GroEL. Dans un premier temps, une purification en deux étapes successives a été effectuée en utilisant deux colonnes de chromatographie différentes, la première avec la résine de nickel (qui permet d'obtenir plus de protéine CGI-58) et la deuxième avec celle de cobalt (vu qu'avec cette résine on n'obtient pas le contaminant GroEL). Les échantillons élués de la première colonne ont été dialysés contre le même tampon d'élution mais sans imidazole avant de faire la deuxième purification pour éliminer l'imidazole. L'utilisation de cette démarche n'a pas vraiment amélioré la pureté de la fraction éluee et on retrouve toujours la protéine GroEL dans l'éluat (**Figure 44, pistes 6 et 7**).



**Figure 44** : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine *MmCGI-58* étiquetée 12xHis en N-terminal en utilisant successivement deux colonnes (nickel puis cobalt). **Piste 1** : éluat de la 1<sup>ère</sup> colonne nickel, avant dialyse pour éliminer l'imidazole ; **piste 2** : éluat de la 1<sup>ère</sup> colonne nickel, après dialyse (fraction chargée sur colonne de cobalt) ; **piste 3** : fraction non liée de la deuxième colonne ; **piste 4** : fraction de lavage de la deuxième colonne ; **Pistes 5, 6 et 7** : éluats successifs ; **piste 8** : marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la protéine CGI-58 et le cadre vert indique la protéine GroEL.

Une autre tentative a été faite pour éliminer le contaminant, la protéine GroEL, en utilisant la chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sepharose. Cette chromatographie est basée sur la différence du point isoélectrique des deux protéines,  $pI = 4,67$  pour la protéine GroEL et  $pI = 6,96$  pour la protéine CGI-58 ; en utilisant donc un tampon à pH de 7, la protéine GroEL sera chargée négativement et elle devrait s'accrocher sur la colonne chargée positivement, alors que la protéine CGI-58 non chargée se retrouvera dans la fraction non liée. En utilisant cette technique, on n'a toutefois pas réussi à séparer les deux protéines, même en changeant la force ionique par lavage de la colonne avec un gradient de NaCl (de 0 à 500 mM), mais ceci sans résultat.

Au vu des résultats de l'optimisation, et du temps passé sans pouvoir séparer les deux protéines GroEL et CGI-58, on a donc décidé de rester sur le protocole de purification par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt qui permet de ne pas avoir la protéine GroEL même si le rendement était faible (~ 12 µg de protéine CGI-58 par litre de culture) (c.f. **Figure 42**, partie 1-1-4-1).

## 2. Tentative de purification de la protéine *AtCGI58* :

Vu son intérêt, d'une part pour son activité potentielle acyltransférase et son rôle potentiel comme cofacteur de l'ATGL, propriétés communes avec la protéine CGI-58 murine, et d'autre part vu que cette protéine *AtCGI-58* contient le pentapeptide Gly-X-Ser-X-Gly, caractéristique des lipases, le travail s'est également centré sur cette protéine (**Figure S1**). Le résidu Ser catalytique potentiel est trouvé dans la séquence des carboxylester hydrolases à sérine, alors que ce résidu est remplacé par une asparagine dans la protéine CGI-58 murine. Nous avons donc décidé dans ce travail de thèse d'étudier en même temps l'homologue de la protéine CGI-58 chez les plantes *Arabidopsis thaliana* (voir partie Bibliographie).

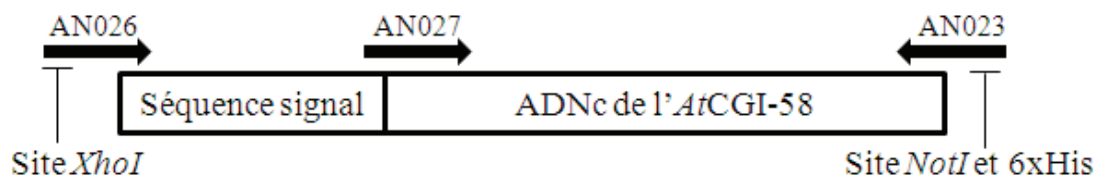


## 2.1. Tentative d'expression dans *P. pastoris* de la protéine AtCGI58 :

On a voulu tester dans un premier temps l'expression de l'homologue chez les plantes notamment chez *Arabidopsis thaliana* de la protéine CGI-58, dans un système d'expression eucaryotique (*Pichia pastoris*) plus évolué mais de même simplicité qu'*E. coli*. Des constructions ont été réalisées dans le vecteur pGAPZαA, le même vecteur d'expression utilisé dans la première tentative d'expression de l'ATGL.

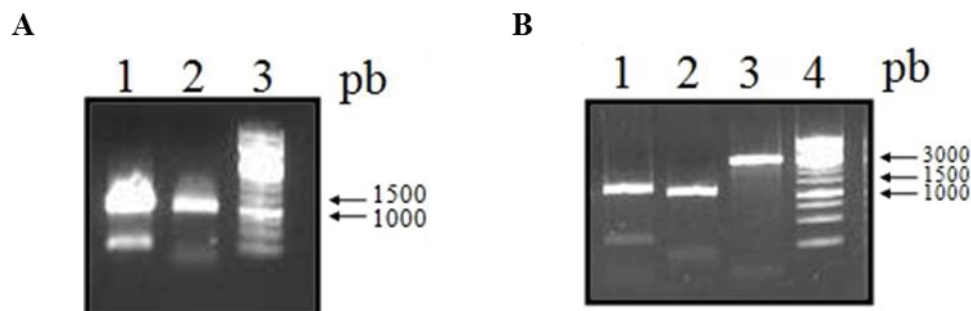
### 2.1.1. Préparation des plasmides :

L'ADN matriciel (gène *At4g24160*) (1257 pb) a été amplifié et modifié par PCR pour avoir deux variants de la même construction : toujours avec une étiquette 6xHis en C-terminal et les deux sites de clonage *XhoI* et *NotI*, mais avec la différence de la présence (version *Full length* ou FL) ou non (version tronquée ou Trc) de la séquence putative d'adressage de cette protéine vers le chloroplaste. Cette séquence, variable et non conservée chez les plantes, est peut-être nécessaire pour l'adressage de la protéine, et pourrait être clivée pour rendre la protéine fonctionnelle ; sans preuve définitive de cette hypothèse deux constructions ont donc été réalisées. La PCR a été effectuée avec la KOD polymérase, en utilisant les amorces suivantes : AN027/AN023 pour la version de protéine CGI-58 Trc et AN026/AN023 pour la construction CGI-58 FL (**Figure 45**).



**Figure 45 :** Positions des amorces AN023, 026 et 027 utilisées pour avoir les deux versions, FL ou Trc, de la protéine AtCGI-58, avec addition des sites *XhoI* en 5', et de *NotI* en 3', et permettant d'obtenir une étiquette 6xHis en C-terminal par fusion avec la séquence nucléotidique du plasmide pGAPZαA.

La vérification de la PCR a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 46 A**).



**Figure 46 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR sur l'ADNc codant la protéine AtCGI-58 (**A**) et du produit de la digestion de l'ADNc de l'AtCGI-58 et du vecteur pGAPZαA (**B**).

**Gel A :** Piste 1 : construction FL ; piste 2 : version Trc ; piste 3 : marqueur de taille.

**Gel B :** Piste 1 : construction FL ; piste 2 : version Trc ; piste 3 : vecteur ; piste 4 : marqueur de taille.

On peut voir dans les pistes 1 et 2 (**Figure 46 A**), une bande entre 1000 et 1500 pb qui correspond à l'ADNc de l'AtCGI-58 (1285 pb pour la FL et 1017 pb pour la Trc). Le produit

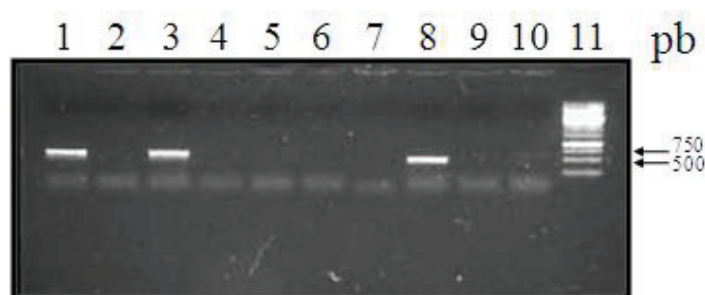


de la PCR a été purifié, digéré ensuite par XhoI et NotI pour générer des extrémités complémentaires pour la ligation dans le vecteur pGAPZαA préalablement préparé dans les mêmes conditions.

La digestion avec XhoI et NotI a été vérifiée par électrophorèse sur gel agarose (**Figure 46 B**). Les pistes 1 et 2 (**Figure 46 B**) correspondent successivement à l'ADNc de la protéine CGI-58 FL et Trc. La bande nucléotidique de la piste 1 est légèrement plus haute que celle de la piste 2 à cause de la présence de la séquence du peptide signal. Pour le vecteur, une seule bande de 3000 pb indique la présence du vecteur digéré et linéarisé (**Figure 46 B**).

Après la ligation des différents ADNc dans le vecteur, les plasmides recombinants sont introduits dans les cellules Top10 en utilisant le protocole de transformation par électroporation (voir Matériel et Méthodes).

La vérification de la ligation et de la transformation a été effectuée par PCR (**Figure 47**) en utilisant l'amorce sens AN029 située sur le promoteur pGAP du vecteur et l'amorce anti-sens AN048 située sur *AtCGI-58*. Une bande nucléotidique de 580 pb indique la présence de l'insert *AtCGI-58 FL* dans le pGAPZαA, et une bande nucléotidique de 540 pb correspond à la version Trc de la protéine CGI-58. Les transformants positifs sont bien identifiés dans les pistes 1 et 3 (*AtCGI-58 FL*) et la piste 8 (*AtCGI-58 Trc*).



**Figure 47** : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR sur les transformants (souche Top10) contenant la construction pGAPZαA-*AtCGI-58*. PCR réalisée en utilisant les amorces AN029 et AN048, une bande nucléotidique entre 500 et 750 pb indique une transformation positive. **Pistes 1 à 5** : transformants 1 à 5 contenant l'ADNc FL ; **pistes 6 à 10** : transformants 6 à 10 contenant l'ADNc Trc ; **piste 11** : marqueur de taille.

Un clone positif de chaque construction (FL et Trc) a été ensuite mis en culture, et l'ADN plasmidique a été purifié et quantifié (235 ng/μL pour la construction *AtCGI-58 Trc* et 230 ng/μL pour la construction *AtCGI-58 FL*), en vue de sa transformation dans la levure *P. pastoris*. Les constructions ont été séquencées pour vérifier l'absence de mutation lors de la PCR, les deux constructions sont bien telles qu'attendues.

Toutefois, au vu des résultats non-encourageants de l'expression de l'ATGL en utilisant le vecteur d'expression pGAPZαA, et de résultats concomitants obtenus pour d'autres protéines au sein du laboratoire, et au vu des expressions et purifications possibles des protéines *MmCGI-58* et ATGL dans le système d'expression procaryotique *E. coli* en utilisant le pET28b(+), où l'on a réussi à purifier les deux protéines, on a donc décidé de laisser ces

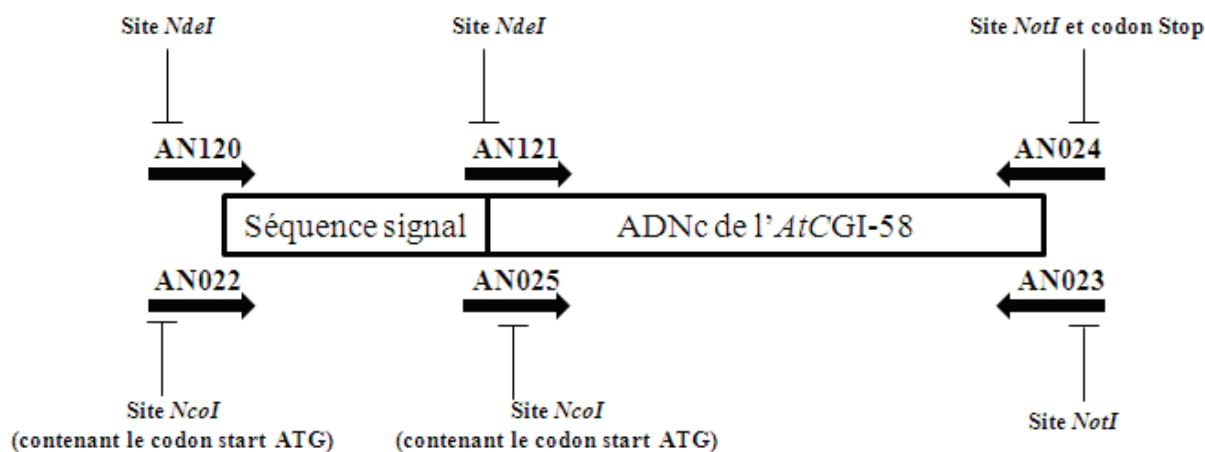
constructions d'*AtCGI-58* clonées dans le pGAPZαA, et de privilégier dans un premier temps les autres constructions réalisées dans le pET28b(+) pour une expression dans *E. coli*.

## 2.2. Tentative d'expression dans *E. coli* (souche BL21(DE3)) de la protéine *AtCGI-58* :

### 2.2.1. Préparation des constructions :

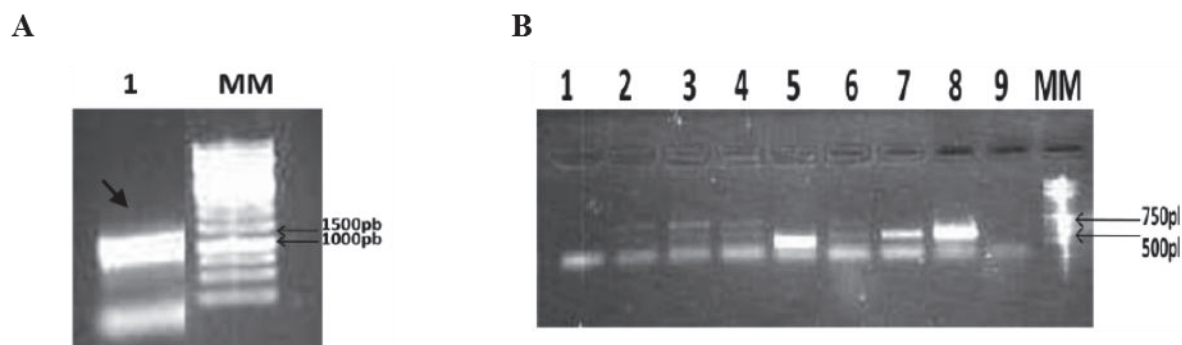
Plusieurs constructions ont été faites pour l'expression de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis*, avec la différence de la présence ou non d'une étiquette 6xHis en N-terminal ou C-terminal, et la différence de la présence ou non de la séquence putative d'adressage vers le chloroplaste, en utilisant le vecteur d'expression pET28b(+) et le système procaryotique *E. coli*.

L'ADN matriciel (gène *At4g24160*), faisant 1257 pb, a été amplifié et modifié par PCR pour avoir les différentes variantes de la même construction : une étiquette 6xHis en N-terminal ou C-terminal, les sites de clonage (*NotI*, *NcoI*) et (*NotI*, *NdeI*) et la présence (version FL) ou non (version Trc) de la séquence putative d'adressage vers le chloroplaste. La PCR a été réalisée avec la KOD polymérase, en utilisant les amorces suivantes : AN022/AN023 pour la construction *AtCGI-58* C-terminal FL, AN025/AN023 pour *AtCGI-58* C-terminal Trc, AN024/AN120 pour *AtCGI-58* N-terminal FL et AN024/AN121 pour *AtCGI-58* N-terminal Trc (**Figure 48**). Le codon start ATG et l'étiquette 6xHis sont en amont du site *NdeI* pour les constructions 6xHis en N-terminal, l'étiquette 6xHis et le codon stop sont en aval du site *NotI* pour les constructions 6xHis en C-terminal.



**Figure 48** : Position des amorces AN022, 023, 024, 025, 120 et 121 utilisées pour obtenir les différentes versions FL et Trc de la protéine *AtCGI-58*, avec l'addition des sites *NotI*, *NcoI* et *NdeI*. Position de l'étiquette 6xHis en N-terminal ou C-terminal par fusion avec la séquence de l'ADN du plasmide pET28b(+).

La vérification de la PCR a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 49 A**) ; j'ai choisi de ne montrer que les résultats de la construction *AtCGI-58* N-terminal Trc.



**Figure 49 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de la PCR sur l'ADNc codant la protéine *AtCGI-58* (A), et du produit de PCR résultant du criblage des bactéries contenant potentiellement la construction pET28b-*AtCGI-58* 6xHis en N-terminal (B).

Gel A : **Piste 1** : construction *AtCGI-58* N-terminal Trc ; **MM** : marqueur de taille. La flèche indique la taille attendue du fragment de PCR (1200 pb).

Gel B : **Piste 1 à 7** : clones 1 à 7 de PCR ; **piste 8** : contrôle positif de PCR (pET28b-*MmCGI-58* 12xHis en N-terminal) ; **piste 9** : contrôle négatif de PCR (pET28b-vide) ; **MM** : Marqueur de taille.

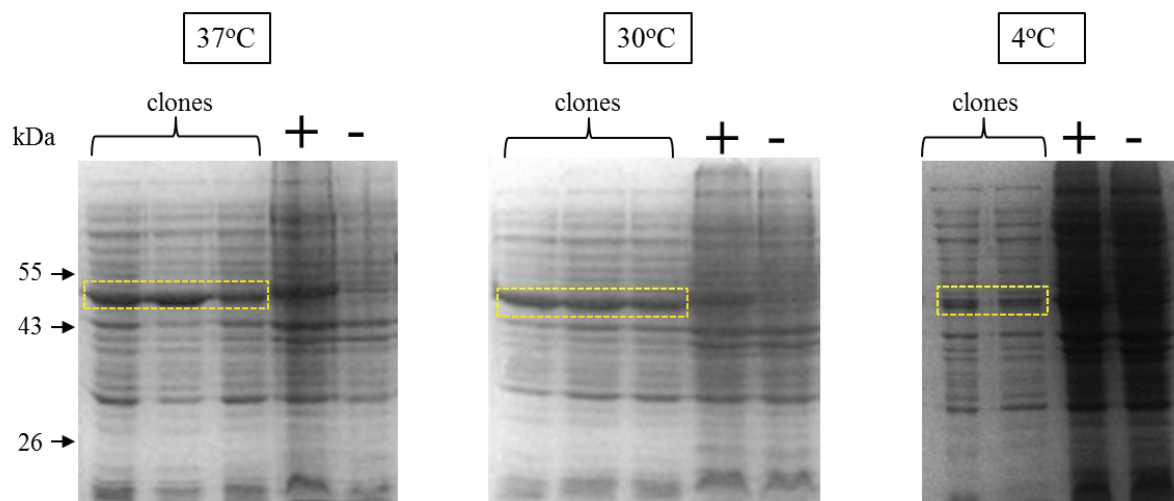
On peut voir dans la piste 1 (**Figure 49 A**) une bande nucléotidique entre 1000 et 1500 pb correspondant à l'ADNc de l'*AtCGI-58* Trc (1200 pb). Le produit de la PCR a été purifié, ensuite digéré par NdeI et NotI pour générer des extrémités complémentaires pour la ligation dans le vecteur pET28b(+) préalablement préparé dans les mêmes conditions.

Après la ligation, faite par la T4 DNA ligase, du fragment de PCR et du vecteur pET28b(+), le plasmide recombinant a été introduit dans les cellules Top10 par électroporation. Le criblage de clones transformés a été réalisé par PCR en utilisant le couple d'amorces sens AN021 située sur le vecteur pET28b(+) et anti-sens AN048 située sur *AtCGI-58* avec une bande attendue de 600 pb. Le résultat de la PCR a été ensuite analysé sur gel d'agarose (**Figure 49 B**).

On remarque que le clone numéro 5 (**Figure 49 B, piste 5**) est positif car il présente une bande nucléotidique à 600 pb, comme obtenu avec le témoin positif (**Figure 49 B, piste 8**) et non observable dans le témoin négatif (**Figure 49 B, piste 9**). Ce clone a ensuite été mis en culture, et l'ADN plasmidique a été purifié par chromatographie échangeuse d'ions (midi-préparation) et quantifié par spectrophotométrie (97,8 ng/μL). Les résultats de séquençage de l'ADN ont montré que l'ADN ne présente aucune mutation par rapport à la séquence initiale.

### 2.2.2. Transformation dans *E. coli* et expression :

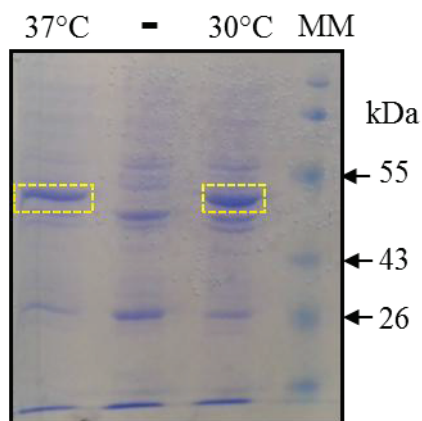
Les différentes constructions pET28b-*AtCGI-58* (Trc ou FL) ont été transférées dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli* par électroporation. Dans un premier temps, nous avons testé l'expression de la construction *AtCGI-58* N-terminal Trc à différentes températures (37, 30 et 4°C) pour 5 h d'induction avec 1 mM d'IPTG (**Figure 50**).



**Figure 50** : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante obtenue à partir de la construction pET28b-*AtCGI-58* N-terminal Trc, pour différentes températures d'induction (37°, 30° et 4°C). On peut voir une expression de la protéine CGI-58 (cadre jaune), dans les différentes conditions, avec une plus forte expression à 37°C. **Clones** : différents clones BL21(DE3) transformés par la construction pET28b-*AtCGI-58* N-terminal Trc ; (+) : contrôle positif exprimant la protéine *MmCGI-58* ; (-) : clone transformé par le plasmide pET28b-vide.

Vu qu'à 37°C nous avons obtenu la plus forte expression de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc, nous avons donc entrepris des tests de purification à partir de ces conditions.

Dans le même temps, nous avons testé l'expression de la construction *AtCGI-58* N-terminal FL dans différentes conditions d'expression (30 et 37°C). L'analyse de l'expression de la protéine sur gel SDS-PAGE montre l'apparition d'une bande protéique aux alentours de 45 kDa qui pourrait correspondre à la protéine *AtCGI-58* (**Figure 51**).

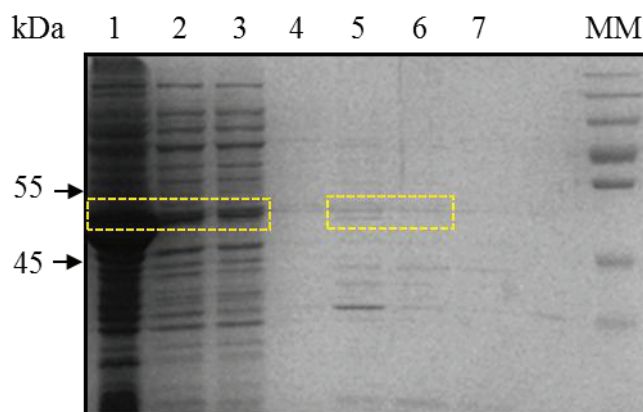


**Figure 51** : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante *AtCGI-58* issue de la construction pET28b-*AtCGI-58* N-terminal FL à différentes températures d'induction (37° et 30°C). Une bande protéique qui correspond à la protéine *AtCGI-58* dans les différentes conditions (cadre jaune). (-) : clone transformé par le plasmide pET28b-vide ; **MM** : marqueur de masse moléculaire.

### 2.2.3. Purification de la protéine *At*CGI-58 Trc étiquetée par 6xHis en N-terminal :

On a voulu tester dans un premier temps la protéine tronquée *At*CGI-58 étiquetée en N-terminal, en effet l'absence du propeptide putatif devrait, en toute logique, permettre d'obtenir une protéine active, c'est pour cela que cette construction a été utilisée pour les premiers tests de purification.

Une purification d'un petit volume de culture (250 mL) sur une colonne de nickel (Ni-TED) a montré que la protéine était soluble et retenue sur la résine. L'analyse des différents échantillons par SDS-PAGE (**Figure 52**) montre que la protéine est présente dans la fraction soluble, mais le degré de pureté était mauvais, avec un faible rendement obtenu dans l'éluat final. La plupart de la protéine est dans la fraction non liée, comme c'est le cas avec la protéine *Mm*CGI-58 (cf. 1.1.3.1). En utilisant d'autres types de résine disponibles au laboratoire (notamment de cobalt), le protocole de la purification de la protéine recombinante a été optimisé à partir de plus grands volumes de culture (1 L ou 4 L), et en utilisant un gradient d'imidazole pour les lavages des résines.



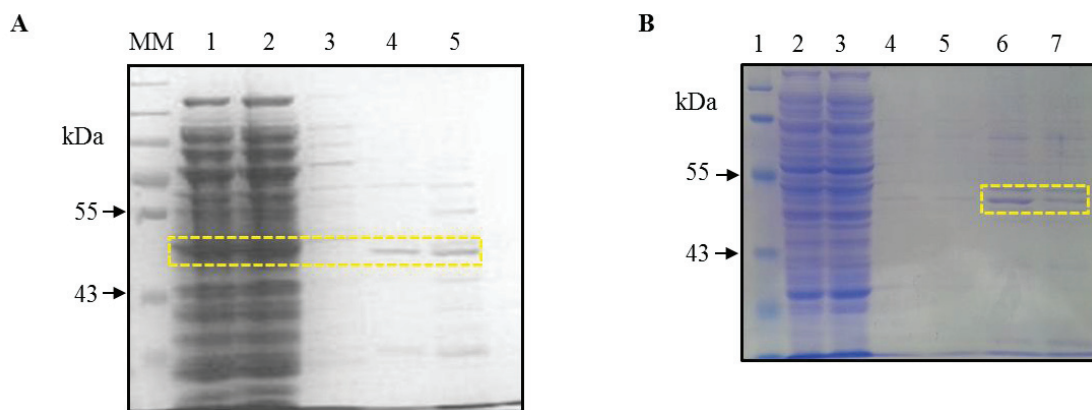
**Figure 52 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *At*CGI-58 N-terminal Trc dans des conditions natives à partir de 250 mL de culture. On entrevoit la bande de 45 kDa qui correspond à la protéine CGI-58 dans l'éluat final (pistes 5 et 6). **Piste 1 :** fraction insoluble ; **piste 2 :** fraction soluble; **piste 3 :** fraction non liée ; **piste 4 :** fraction de lavage; **pistes 5, 6 et 7 :** éluats successifs ; **MM :** marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la présence de la protéine CGI-58.

### 2.2.4. Optimisation de la purification en conditions natives sur colonne de nickel :

Attendu qu'une grande partie de la protéine *At*CGI-58 était dans la fraction non liée, nous avons donc essayé dans un premier temps d'augmenter la quantité de culture cellulaire induite à purifier, nous sommes donc passé d'un volume de 250 mL à 1 L de culture, en conservant toujours la colonne de nickel et le lavage sans imidazole.

L'analyse du gel SDS-PAGE des différents échantillons de la purification (**Figure 53 A**), montre qu'en augmentant la quantité initiale de culture on augmente, comme prévu, la quantité de la protéine dans la fraction finale éluee avec un rendement d'environ 60 µg de protéine pour 1 L de culture. Malheureusement, la plus grande partie de la protéine est perdue et se retrouve dans la fraction non liée (**Figure 53 A, piste 2**).





**Figure 53 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives, à partir d'un litre de culture cellulaire (A) et en lavant la résine avec 20 mM d'imidazole avant l'étape d'élution (B). Dans les deux cas, une bande protéique de 45 kDa correspondant à la protéine CGI-58 est visible dans l'éluat final (gel A, pistes 4 et 5 et gel B, pistes 6 et 7).

**Gel A :** Piste 1 : fraction soluble ; piste 2 : fraction non liée ; piste 3 : fraction de lavage ; pistes 4 et 5 : éluats successifs ; (MM) : marqueur de masse moléculaire. **Gel B :** Piste 1 : marqueur de masse moléculaire ; piste 2 : fraction soluble ; piste 3 : fraction non liée ; pistes 4 et 5 : fractions de lavages ; pistes 6 et 7 : éluats successifs. Le cadre jaune indique la présence de la protéine CGI-58.

En analysant les pistes 4 et 5 de la **figure 53 A**, on peut voir, dans l'éluat final, la présence de quelques protéines contaminantes, c'est donc pour augmenter le degré de pureté de l'échantillon que nous avons décidé de faire un gradient d'imidazole pour voir à quelle concentration on pourrait laver la résine sans décrocher la protéine *AtCGI-58*. Nous avons donc lavé la résine avec un gradient d'imidazole de concentrations suivantes : 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100 et 250 mM. Nous avons remarqué (résultat non présenté) qu'un lavage avec 20 mM d'imidazole ne décroche pas la protéine d'intérêt, et donc une purification à partir d'un litre de culture cellulaire a été entreprise dans ces conditions. L'analyse des différentes fractions a été faite sur gel SDS-PAGE (**Figure 53 B**).

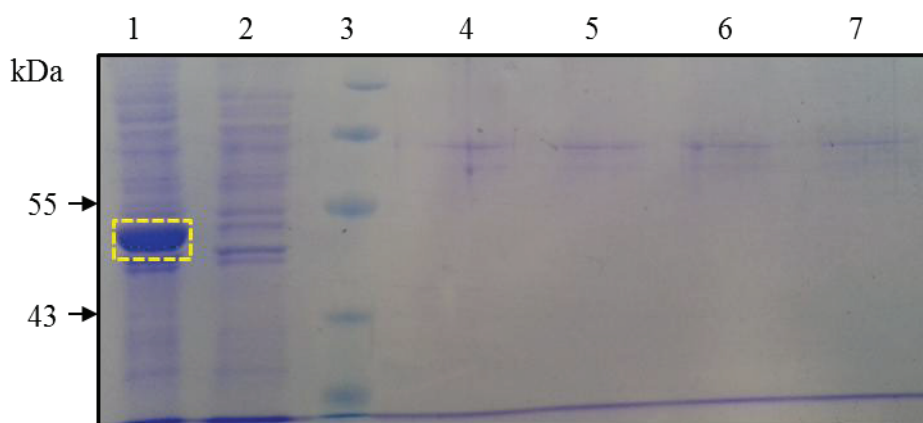
L'analyse des résultats de la purification montre que dans ces conditions, et en utilisant la résine de nickel, le degré de pureté de l'éluat final n'a pas été grandement amélioré et on retrouve toujours des contaminants. On a décidé donc d'essayer d'autres conditions et de faire une purification dans des conditions dénaturantes, comme celle faite par Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009) et voir si on obtenait une meilleure purification.

## 2.2.5. Purification en conditions dénaturantes de la protéine *AtCGI-58* étiqueté en N-terminal et tronquée :

Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009) ont publié une purification de la protéine *AtCGI-58* dans des conditions dénaturantes, où ils montrent une bande protéique sur gel SDS-PAGE qui correspond à la protéine CGI-58 dans l'éluat final. Après avoir dissout les corps d'inclusions dans un tampon Tris-HCl contenant 6 M d'urée et 25 mM d'imidazole, les auteurs ont procédé par la suite à une étape de renaturation de la protéine sur colonne de nickel à partir de la fraction solubilisée. La colonne est lavée d'abord par du tampon sans urée et contenant 25 mM d'imidazole et la protéine élue de la colonne en présence de 250 mM d'imidazole (Ghosh *et al.*, 2009).



Nous avons donc essayé de reproduire le protocole développé par Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2009), en utilisant les mêmes conditions expérimentales. L'analyse du résultat par SDS-PAGE des différentes fractions (**Figures 54**), montre que la protéine *AtCGI-58* a été bien retenue sur la colonne de nickel car absente dans la fraction non liée (**Figure 54, piste 2**). Par contre, elle n'est pas éluée et ne se retrouve pas dans l'éluat final (**Figure 54, pistes 5, 6 et 7**).



**Figure 54** : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc par chromatographie d'affinité dans des conditions dénaturantes, à partir d'une culture cellulaire d'un litre, et renaturation sur colonne de nickel. Une bande protéique de 45 kDa qui correspond à la protéine CGI-58 est visible dans la fraction soluble (piste 1) mais pas dans l'éluat (pistes 6 et 7). **Piste 1** : fraction soluble dans 6 M d'urée ; **piste 2** : fraction non liée ; **piste 3** : marqueur de masse moléculaire ; **piste 4** : fraction de lavage sans urée ; **pistes 5, 6 et 7** : éluats successifs. Le cadre jaune indique la présence de la protéine CGI-58.

Nous avons donc tenté de reproduire le protocole plusieurs fois, dans chaque tentative une ou deux conditions ont été changées ; nous avons essayé le même protocole pour purifier à partir de 250 mL ou 1 L de culture, nous avons utilisé plusieurs résines comme le Ni-TED, le Ni-NTA ou le cobalt, plusieurs volumes de lavage (15, 20 ou 30 mL) par le tampon Tris-HCl contenant 6 M d'urée ont été testés, nous avons aussi essayé de faire l'élution par le tampon Tris-HCl contenant 8 M d'urée, mais quelles que soient les conditions utilisées nous n'avons pas réussi à obtenir la protéine CGI-58 dans l'éluat final.

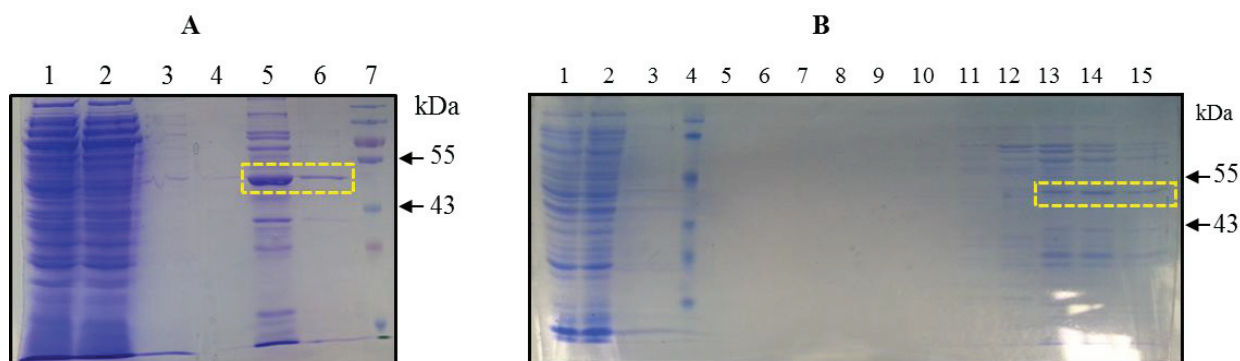
Suite au changement brusque de la concentration d'urée (de 6 à 0 M), et par suite probable d'un changement de la conformation de la protéine, il semble que la protéine a dû ou bien précipiter, ou bien rester accrochée à la colonne, peut-être suite à une augmentation d'affinité à la résine, induite par le changement de conformation.

Au vu de ces résultats, en utilisant la colonne de nickel, et vu les résultats de la purification de la protéine *MmCGI-58* sur colonne de cobalt qui avait donné des résultats satisfaisants (**cf. 1.1.4.1**), on a donc procédé à la purification de la protéine *AtCGI-58* en utilisant une chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt.

#### **2.2.6. Purification sur colonne de cobalt de la protéine *AtCGI-58* étiquetée en N-terminal et tronquée :**

On a effectué dans un premier temps la purification de la protéine *AtCGI-58* à partir d'un litre de culture, dans des conditions natives sans lavage avec l'imidazole. L'analyse des échantillons par SDS-PAGE (**Figure 55 A**) montre que la protéine a bien été retenue sur la

colonne de cobalt et éluée dans la fraction finale (**Figure 55 A, pistes 5 et 6**). Cependant, bien que la fraction élue soit bien enrichie en protéine d'intérêt, plusieurs contaminants restent présents (**Figure 55 A, piste 5**).



**Figure 55 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives (**A**) et en utilisant un gradient d'imidazole (**B**) purification par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt à partir d'un litre de culture cellulaire.

**Gel A :** **Piste 1 :** fraction soluble ; **piste 2 :** fraction non liée; **pistes 3 et 4 :** fractions de lavage ; **pistes 5 et 6 :** éluats successifs; **piste 7 :** marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la protéine CGI-58.

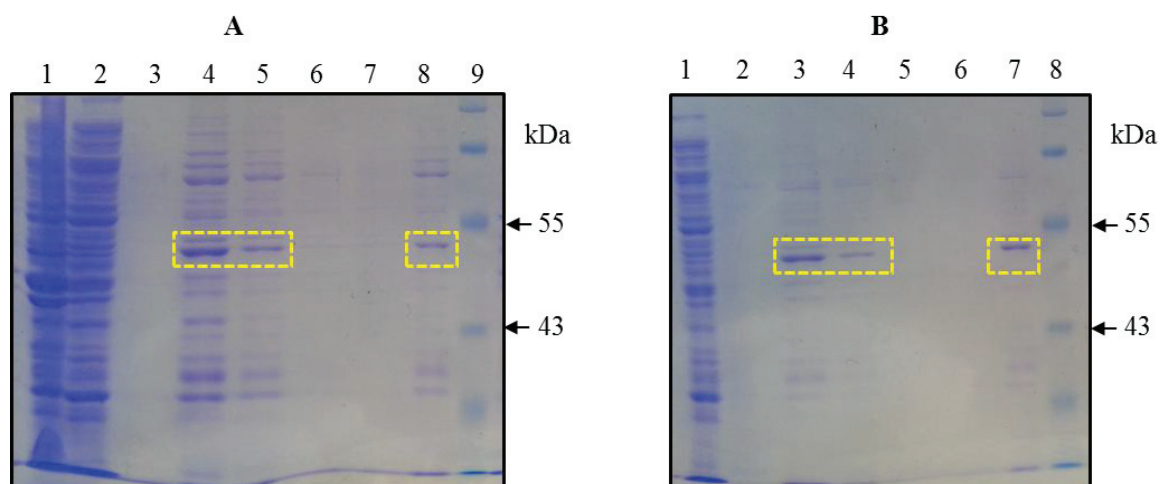
**Gel B :** **Piste 1 :** fraction soluble ; **piste 2 :** fraction non liée; **piste 3 :** fraction de lavage ; **piste 4 :** marqueur de masse moléculaire ; **pistes 5 à 15 :** élution avec gradient d'imidazole correspondant respectivement à 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 et 250 mM d'imidazole. Le cadre jaune indique la présence de la protéine CGI-58.

Dans un deuxième temps, la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminale Trc par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt a été reconduite mais cette fois-ci l'élution de la protéine retenue s'est effectuée par un gradient en escalier (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 et 250 mM) d'imidazole dans le but d'éliminer le plus possible des contaminants. L'analyse par SDS-PAGE des différentes fractions éluées est montrée dans la **figure 55 B**. Une bande protéique d'environ 45 kDa et qui correspond à la protéine CGI-58 est identifiée dans l'éluat à 50, 100 et 250 mM d'imidazole (**Figure 55 B, pistes 13, 14 et 15**).

On a pu remarquer qu'en utilisant une concentration aux alentours de 20 mM d'imidazole dans le lavage, on pouvait améliorer le rendement et la pureté de l'échantillon final, et donc deux purifications sur colonne de cobalt ont été faites en parallèle en utilisant pour chacune, 1 L de culture induite, et des conditions natives, et en lavant dans la première colonne avec 15 mM d'imidazole et la seconde avec 25 mM d'imidazole. Les résultats de ces deux purifications ont été analysés sur SDS-PAGE (**Figure 56**).

Il est clair à partir de la **figure 56**, qu'un lavage de la colonne avec 25 mM d'imidazole a permis de purifier la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc (**Figure 56, piste 7**) dépourvue de la majorité des contaminants ce qui a permis d'obtenir un rendement de 200 µg de protéine par litre de culture.

En conclusion de cette partie de travail et après tous les efforts entrepris et les conditions testées (changement de résine, concentration d'imidazole, quantité de culture induite à purifier...), on a réussi à obtenir une protéine purifiée en conditions natives et pratiquement homogène sur gel SDS-PAGE.



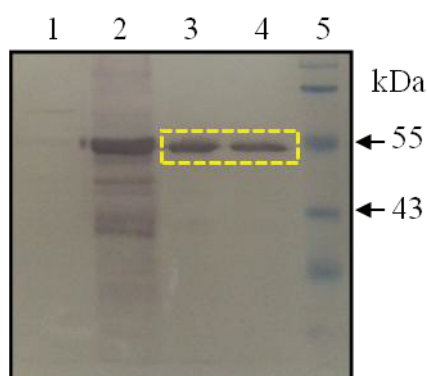
**Figure 56 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt, à partir d'un litre de culture, et en lavant la colonne avec 15 mM (A) ou 25 mM (B) d'imidazole.

**Gel A :** **Piste 1 :** fraction soluble ; **piste 2 :** fraction non liée; **piste 3 :** fraction de lavage avec 15 mM d'imidazole; **Pistes 4 à 7 :** éluats successifs ; **piste 8 :** éluat dessalé sur colonne PD10 pour éliminer l'imidazole; **piste 9 :** marqueur de masse moléculaire.

**Gel B :** **Piste 1 :** fraction non liée ; **piste 2 :** fraction de lavage ; **pistes 3 à 6 :** éluats successifs ; **piste 7 :** éluat dessalé sur colonne PD10 pour éliminer l'imidazole ; **piste 8 :** marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la présence de la protéine CGI-58.

### 2.2.7. Analyse par immunoempreinte de la protéine *AtCGI-58* étiquetée en N-terminal et tronquée :

L'identité de la protéine élue à partir de la résine cobalt a été vérifiée par immunoempreinte en utilisant un anticorps anti poly-histidines, vu que la protéine *AtCGI-58* est étiquetée en N-terminal par une étiquette 6xHis. Le résultat est présenté dans la **Figure 57**, où on voit bien une bande protéique au même niveau (45 kDa) que la protéine *MmCGI-58* (utilisée comme contrôle positif, piste 2), et qui correspond donc bien à la protéine *AtCGI-58*. La protéine ainsi purifiée en conditions natives va pouvoir être utilisée pour des tests d'activité enzymatique.



**Figure 57 :** Analyse par immunoempreinte de l'identité de la protéine purifiée *AtCGI-58* N-terminal Trc dans des conditions natives, analyse en utilisant des anticorps anti poly-histidines.

**Piste 1 :** contrôle négatif (purification issue de l'expression du vecteur vide) ; **piste 2 :** contrôle positif (protéine *MmCGI-58* purifiée sur résine de cobalt) ; **pistes 3 et 4 :** protéine *AtCGI-58* ; **piste 5 :** marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la position de la protéine CGI-58.

### **3. Tests d'activité enzymatique *in vitro* de la protéine CGI-58 purifiée à partir de la souche BL21(DE3) d'*E. coli* :**

Les échantillons purifiés de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* ou murine, sur résine cobalt, ont été testés *in vitro* pour les activités enzymatiques citées dans la littérature.

A ce stade de mon travail de thèse, la protéine CGI-58 murine et celle d'*Arabidopsis* purifiées à partir de la souche BL21(DE3) d'*E. coli* étaient décrites comme possédant une activité LPAAT (Ghosh *et al.*, 2009) (Montero-Moran *et al.*, 2010). En plus de l'activité LPAAT, une activité lipase et phospholipase ont été décrites pour la protéine AtCGI-58 exprimée dans la même souche d'*E. coli* et purifiée en utilisant le protocole de purification décrit dans la partie (2.2.5), et que l'on avait pas réussi à reproduire.

L'activité LPAAT de la protéine MmCGI-58 et la protéine AtCGI-58 a donc été testée, de même que l'activité lipase et phospholipase de la protéine AtCGI-58, vu que la sérine de la triade catalytique retrouvée dans la protéine AtCGI-58 est remplacée par une asparagine dans la protéine MmCGI-58 (**Figure S1**).

Les tests réalisés par les deux équipes, Brasaemle *et al.* et Rajasekharan *et al.*, ont été faits en utilisant des substrats radiomarqués. A ce stade de mon travail de thèse, nous n'avions pas la possibilité d'effectuer au laboratoire des tests enzymatiques en utilisant des substrats radiomarqués, et on a donc testé *in vitro* les différentes activités en utilisant des substrats lipidiques non radiomarqués et en analysant les produits de réaction par CCM.

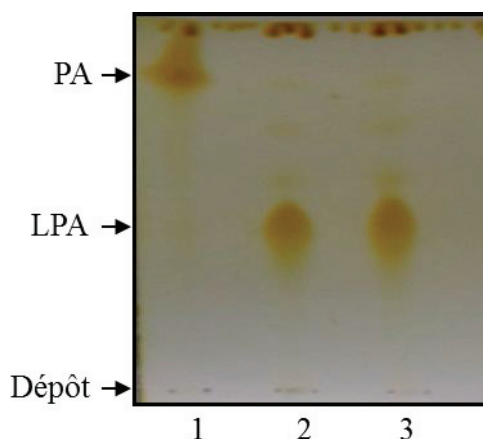
Pour vérifier qu'on pourrait bien détecter la formation du PA par CCM, [vu que l'activité LPAAT décrite pour la protéine CGI-58 était faible (Ghosh *et al.*, 2009) (Montero-Moran *et al.*, 2010), elle a été mesurée par radiochimie, comme étant de l'ordre de 6 nmol de PA formé par mg d'enzyme pendant une minute], un test de limite de détection a été réalisé en déposant plusieurs quantités de PA sur plaque de CCM pour voir la quantité minimale détectable par révélation à l'iode, technique utilisée à ce stade de mon travail de thèse. Nous avons trouvé (résultat non présenté) que la quantité minimale détectable de PA par CCM était de 1 µg (1,4 nmol), donc pour dépasser le seuil de détection pour un test enzymatique de 30 min, on avait besoin d'environ 30 µg de protéine CGI-58.

#### **3.1. Tests d'activité LPAAT *in vitro* de la protéine CGI-58 mesurés par CCM :**

Dans ces tests, la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* ou murine a été incubée avec l'acide oléoyl-lysophosphatidique (oléoyl-LPA) en présence d'oléoyl-CoA (coenzyme A) comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Le test a été effectué pour 30 min à 37°C, ensuite la réaction a été arrêtée, et l'extraction des lipides a été réalisée par chloroforme/méthanol.

L'extrait lipidique des échantillons testés a été séparé et analysé par CCM dans un solvant chloroforme/méthanol/acétone/acide acétique/eau (50/10/20/15/5), dans ce système le Lyso-PA migre au milieu de la plaque alors que le produit de la réaction, le PA, migre vers le front de migration.

Vu que l'activité LPAAT décrite pour la protéine CGI-58 était faible, on a donc utilisé une plus grande quantité d'enzyme (dans ce test 50  $\mu$ g ont été utilisés) afin d'être dans la gamme de détection du PA par CCM. Plusieurs essais enzymatiques ont été effectués, en variant la quantité d'enzyme, dans les mêmes conditions expérimentales décrites par (Ghosh *et al.*, 2009) (Montero-Moran *et al.*, 2010), mais aucune formation de PA n'a pu être détectée visuellement à l'iode (**Figure 58**).



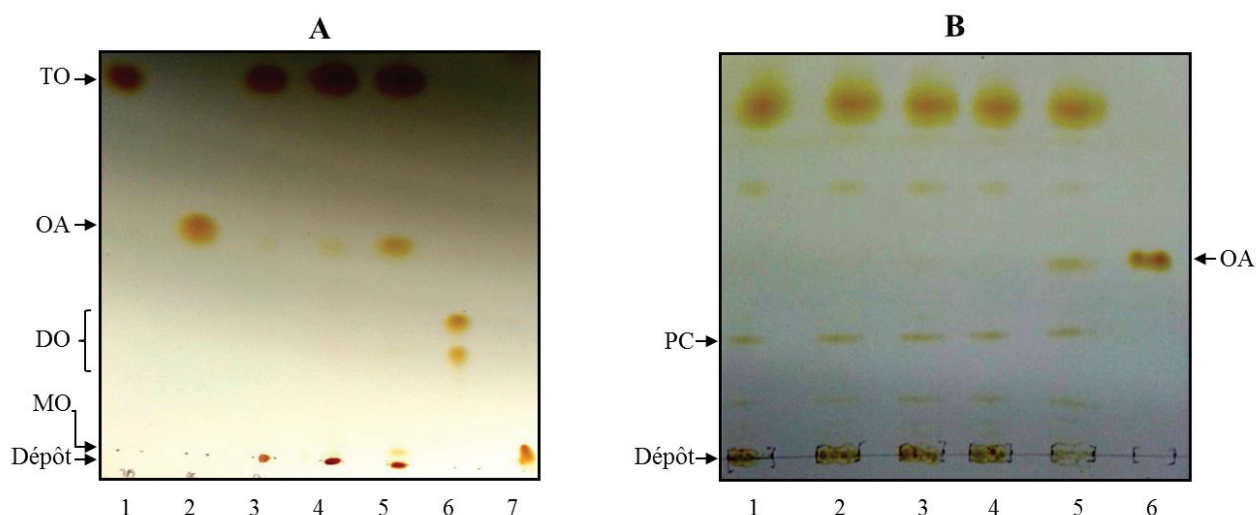
**Figure 58** : Analyse de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par CCM. **Piste 1** : contrôle de migration du PA ; **piste 2** : extrait lipidique de la réaction catalysée par 50  $\mu$ g de protéine *Mm*CGI-58 ; **piste 3** : extrait lipidique de la réaction catalysée par 50  $\mu$ g de protéine *At*CGI-58.

### 3.2. Tests d'activité lipase et phospholipase *in vitro* de la protéine *At*CGI-58 :

Les activités lipase et phospholipase rapportées pour la protéine *At*CGI-58 (Ghosh *et al.* 2009) ont été mesurées en utilisant la technique de spectrométrie de masse (MS) avec des valeurs respectivement de l'ordre de 7 et 20 pmol / mg d'enzyme / h. Nous avons, dans un premier temps, testé la présence d'éventuelles activités lipase et phospholipase par analyse des produits d'hydrolyse par CCM. Après avoir incubé la protéine *At*CGI-58 avec la trioléine (TO) pour l'activité lipase, ou la PC pour l'activité phospholipase pendant 1 h à 37°C, les produits de la réaction ont été extraits et analysés par CCM (**Figure 59**).

Plusieurs quantités de protéine ont été testées mais nous n'avons pas réussi à détecter une activité ni lipase (**Figure 59 A**) ni phospholipase (**Figure 59 B**), alors qu'on voit bien l'apparition du produit de la réaction catalysée par la TLL (**Figure 59 A, piste 5**) et par la PLA<sub>2</sub> (**Figure 59 B, piste 5**), utilisées comme contrôles positifs.



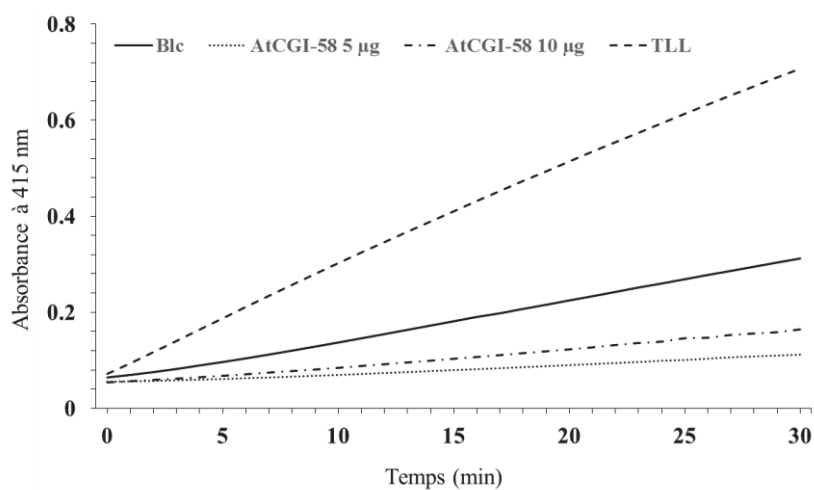


**Figure 59** : Analyse de l'activité TG lipase (A) et phospholipase (B) de la protéine *AtCGI-58* par CCM.

**A.** **Piste 1** : contrôle de migration du TO ; **piste 2** : contrôle de migration de l'acide oléique (OA) ; **piste 3** : extrait lipidique du contrôle négatif réalisé sans protéine ; **piste 4** : extrait lipidique de la réaction catalysée par 10  $\mu\text{g}$  de protéine *AtCGI-58* ; **piste 5** : extrait lipidique de la réaction catalysée par 10  $\mu\text{g}$  de TLL ; **piste 6** : contrôle de migration du dioléine ; **piste 7** : contrôle de migration de la monooléine (MO).

**B.** **Piste 1** : extrait lipidique du contrôle négatif réalisé sans protéine ; **pistes 2, 3 et 4** : extrait lipidique de la réaction catalysée par 5, 10 et 20  $\mu\text{g}$  de protéine *AtCGI-58*, respectivement ; **piste 5** : extrait lipidique de la réaction catalysée par 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{PLA}_2$  (contrôle positif) ; **piste 6** : contrôle de migration de l'acide oléique.

Nous avons testé par la suite l'activité estérasique de la protéine *AtCGI-58* en utilisant un substrat chromogénique, le 4-nitrophényl palmitate (4-NPP) (voir Matériel et Méthodes). La protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* a été donc incubée avec le 4-NPP pour 30 min à 37°C, et l'absorbance à 415 nm a été mesurée toutes les minutes (**Figure 60**). En comparaison avec l'hydrolyse du 4-NPP par la TLL, aucune activité estérasique n'a pu être détectée pour la protéine *AtCGI-58* (5 ou 10  $\mu\text{g}$  par essai), les DO mesurées étaient inférieures à celles retrouvées dans l'essai à blanc, la protéine CGI-58 pouvant peut-être protéger de la photo-dégradation du substrat.

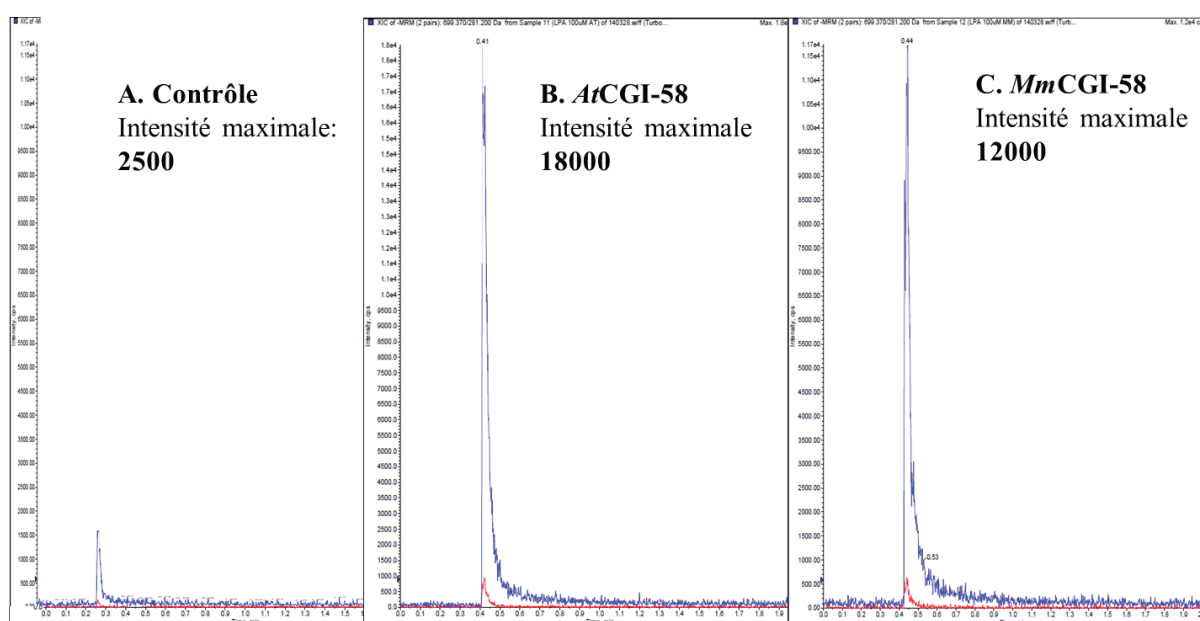


**Figure 60** : Cinétique d'hydrolyse du 4-NPP par la protéine *AtCGI-58*. (**Blc**) : contrôle négatif réalisé sans enzyme.



### 3.3. Détection de l'activité LPAAT *in vitro* de la protéine CGI-58 par spectrométrie de masse :

Nous avons également testé l'activité LPAAT par cette technique en mesurant le produit de la réaction (PA) après incubation des substrats (oléoyl-LPA et oléoyl-CoA) en présence de la protéine CGI-58 recombinante pour 1 h à 37°C. D'après les résultats obtenus (**Figure 61**), nous avons réussi à détecter une activité LPAAT pour les deux protéines CGI-58, celle d'*Arabidopsis* et celle murine, on remarque en effet l'apparition du produit de la réaction le dioléoyl-PA avec une intensité (unité arbitraire) de 18000 (**Figure 61 B**) et 12000 (**Figure 61 C**) pour la protéine *At*CGI-58 et la CGI-58 murine, respectivement, par rapport à une intensité de 2500 pour le contrôle négatif réalisé dans les mêmes conditions expérimentales mais sans protéine (**Figure 61 A**). Avec cette technique, l'intensité détectée est directement proportionnelle à la quantité de PA dans l'échantillon.



**Figure 61 :** Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 recombinante.

(A) : Contrôle négatif pour une réaction effectuée sans protéine, (B) : Intensité du signal détecté en présence de la protéine *At*CGI-58 et (C) : Intensité du signal détecté en présence de la protéine *Mm*CGI-58.

C'est alors qu'en 2014, McMahon *et al.* (McMahon *et al.* 2014) de l'équipe du Prof. Brasaemle qui avait rapporté l'activité LPAAT pour la protéine *Mm*CGI-58 en 2010, ont démontré que l'activité détectée pour la protéine CGI-58 murine purifiée à partir de la souche BL21(DE3) n'était en fait qu'un artefact dû à la présence d'un contaminant issu de cette souche bactérienne. Dans le même travail, les auteurs ont identifié le contaminant comme étant la protéine plsC ou phospholipide synthétase C (l'enzyme responsable de l'activité LPAAT chez *E. coli*). Nous en avons donc déduit ce que nous avons précédemment détecté comme activité LPAAT par chromatographie liquide couplée à la MS n'était en réalité que l'activité de la protéine plsC co-purifiée avec la protéine CGI-58 à partir de cette même souche BL21(DE3).

A l'issue de ces résultats, toutes les activités enzymatiques (LPAAT, lipase et phospholipase) montrées par l'équipe Rajasekharan (Ghosh *et al.* 2009) pour la protéine AtCGI-58 pouvaient être aussi suspectées comme étant dues à la présence d'un contaminant.

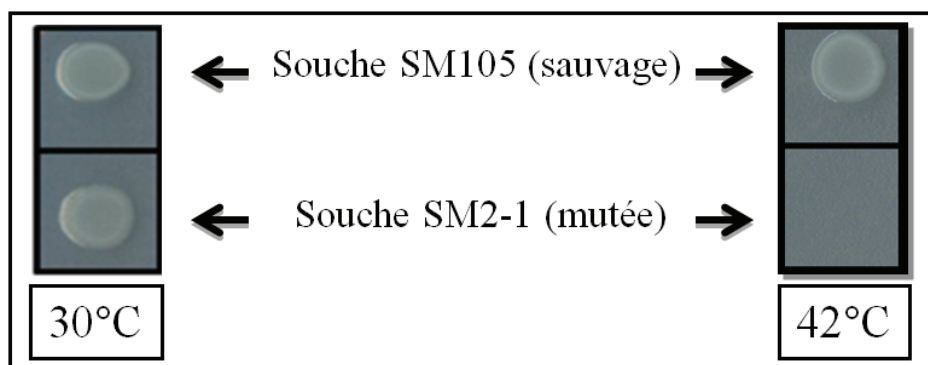
Pour répondre à cette question et clarifier la nature des activités enzymatiques potentielles de la protéine CGI-58, nous avons testé trois approches différentes :

- Tester l'activité LPAAT potentielle *in vivo* pour la protéine CGI-58.
- Purifier la protéine CGI-58 à partir d'une autre souche que la souche BL21(DE3), contenant une enzyme *plsC* mutée et non fonctionnelle (la souche SM2-1).
- Générer des protéines CGI-58 mutées sur les acides aminés catalytiques potentiels et tester, par la suite, leurs activités enzymatiques par rapport à la protéine sauvage.

#### 4. Tests de mesure de l'activité LPAAT *in vivo* de la protéine CGI-58 :

Avant ce stade de ma thèse, les protéines CGI-58 ayant été montrées comme catalysant une activité LPAAT, nous voulions déjà utiliser cette capacité sous un angle fonctionnel afin de tester par complémentation des mutants potentiellement catalytiques de la protéine CGI-58. Le but de cette approche était donc d'élaborer un système simple et fonctionnel pour valider ou pas l'activité LPAAT *in vivo*, et pour cribler des mutations au niveau de la protéine CGI-58, inhérentes au syndrome de Chanarin-Dorfman.

Le principe de cette approche était basé sur l'utilisation de la souche SM2-1 d'*E. coli*, qui est caractérisée par une mutation ponctuelle au niveau du gène qui code l'enzyme *plsC* (la même souche SM2-1 que celle qui sera utilisée par McMahon *et al.* 2014 pour la purification de la protéine *MmCGI-58*). Cette enzyme *plsC* possède une activité acyltransférase, homologue à celle décrite pour la protéine CGI-58. L'enzyme catalyse le transfert d'une chaîne acyle activée sous forme d'acyl-CoA vers le lyso-PA. Cette mutation au niveau de *plsC* entraîne un phénotype particulier, elle empêche la croissance de la souche SM2-1 à 42°C, comparé à la souche sauvage (SM105) qui pousse normalement à 42°C. Les deux souches, mutée et sauvage, sont capables de pousser à 30°C (**Figure 62**).



**Figure 62 :** Croissance comparée, à 30° et 42°C sur boîte LB agar, de la souche sauvage (SM105) et de la souche mutée (SM2-1) pour le gène *plsC*.

Il s'agissait de vérifier si, en présence de la protéine CGI-58, la souche SM2-1 peut croître à 42°C, et donc tester si l'expression de la protéine CGI-58 *in vivo* dans la souche SM2-1 restaure le phénotype sauvage. Ce test de criblage par le phénotype de croissance à

42°C permettra de démontrer si l'enzyme CGI-58 possède ou pas une activité acyltransférase *in vivo*.

Mais il existait une difficulté pour l'expression de la protéine CGI-58 dans la souche SM2-1, en effet, les différentes versions du gène *CGI-58* sont clonées dans le plasmide pET28b(+) utilisé pour la production des protéines recombinantes. Le gène *CGI-58* est ainsi sous la dépendance du *promoteur T7*, sa transcription est donc dépendante de la présence de la T7 RNA polymérase. Le gène de la *T7 RNA polymérase* est absent de la souche SM2-1 mais présent dans la souche BL21, souche utilisée pour la surexpression des protéines recombinantes. Il aurait été envisageable soit de recloner toutes les constructions dans un vecteur, tel le pBAD dépendant de la RNA polymérase bactérienne, soit de transférer la mutation *plsC* de la souche SM2-1 vers la souche BL21 par transduction à l'aide du phage P1 par exemple. Cependant, en raison de l'absence de marqueur, tel un gène de résistance à un antibiotique, couplé à la mutation SM2-1, il est impossible, aisément, à l'aide du phage P1, de transduire la mutation de la souche SM2-1 vers la souche BL21, à moins de cribler une vaste collection de clones pour le phénotype de croissance à 42°C (qui impliquerait de faire la transduction à 30°C, et de faire des réplicats à 42°C pour cribler le phénotype).

Nous avons également envisagé de tester la caractéristique "*leaky*" inhérente au *promoteur T7* et décrite par le fournisseur (Novagen), dans ce cas, soit ce promoteur peut être reconnu par la RNA polymérase bactérienne, soit la synthèse d'un ARNm de type « opéronique » à partir d'un autre promoteur se situant sur le plasmide, comme celui de la résistance à l'antibiotique, permet la synthèse de l'ARNm du gène d'intérêt. De deux choses l'une : soit le promoteur est véritablement "*leaky*" dans notre souche d'intérêt, et on pourra alors observer si le peu d'ARNm de *CGI-58* ainsi synthétisé permet la complémentation phénotypique de la souche SM2-1, en effet si le pET28b(+) est un vecteur utilisé pour la surexpression des protéines recombinantes (jusqu'à 10-20 % des protéines totales), une complémentation nécessite bien moins de protéines, dans ce cas, l'apport de la T7 RNA polymérase dans la souche SM2-1 ne sera plus indispensable, soit le promoteur n'est pas "*leaky*" dans la souche SM2-1 et dans ce cas, il faudra apporter le gène de cette T7 RNA polymérase de manière exogène *via* un second plasmide.

Par une expérience colorimétrique, nous avons cherché dans un premier temps, avec l'aide d'un stagiaire, Yani Arhab, à visualiser si on était capable d'observer la synthèse d'un gène cloné sous la dépendance du promoteur T7 dans le plasmide pET28b(+), en absence ou en présence de la T7 RNA polymérase.

#### **4.1. Co-expression du gène de la T7 RNA polymérase avec le plasmide pET28b(+) :**

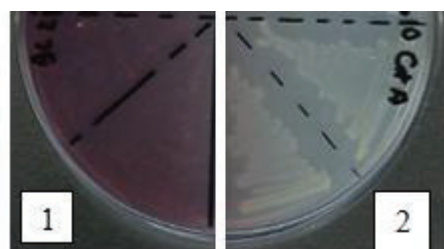
##### **4.1.1. Test du caractère "*leaky*" du *promoteur T7* :**

La protéine CotA de *Bacillus subtilis* est une oxydase de la famille des laccases, des oxydases à cuivre qui possèdent un large spectre de substrats. Entre autres, elles sont capables d'oxyder l'ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) présent dans le milieu de culture en un produit rougeâtre, et donc de colorer ce milieu de culture. Au laboratoire, le gène *CotA* est, comme les gènes *CGI-58*, cloné dans le plasmide pET28b(+) en aval du

promoteur de la T7 RNA polymérase lui-même sous le contrôle de l'opéron lactose. La protéine CotA est donc inductible en présence de la T7 RNA polymérase permettant, par le produit de l'oxydation de l'ABTS, la coloration en rouge du milieu de culture.

Cette construction a été transformée à la fois dans les souches BL21 et Top10. La souche BL21 exprime la T7 RNA polymérase. A l'inverse la souche Top10 ne possède pas le gène *T7 RNA polymérase* dans son génome.

Deux clones résistants à la kanamycine issus de chaque transformation (Top10 et BL21) ont été repiqués sur un milieu solide LB avec de la kanamycine, de l'ABTS pour la réaction colorimétrique, du sulfate de cuivre cofacteur des laccases et de l'IPTG pour l'induction de la protéine CotA (**Figure 63**).



**Figure 63 :** Criblage du caractère "leaky" du promoteur T7 par détection de l'expression de la protéine CotA sur milieu LB avec le sulfate de cuivre (250  $\mu$ M), ABTS (1 mM) et IPTG (10  $\mu$ M).

**Partie 1 :** souche BL21 transformée par pET28b-*CotA* ; **Partie 2 :** souche Top10 transformée par pET28b-*CotA*.

Après 4 jours d'incubation, la laccase clonée dans le plasmide pET28b(+) est exprimée et a permis d'oxyder l'ABTS et donne cette coloration rouge due à l'accumulation du produit d'oxydation de l'ABTS. Même si l'expression de cette enzyme est normalement intracellulaire, il est fort probable que l'enzyme soit re-larguée dans le milieu lors de la mort des cellules. Cette coloration rougeâtre n'apparaît que pour les cellules BL21 (**Figure 63, partie 1**) or celles-ci synthétisent la T7 RNA polymérase. Ce n'est pas le cas des cellules Top10 (**Figure 63, partie 2**), l'oxydation de l'ABTS n'est pas visible donc la laccase n'est probablement pas transcrite, du moins pas en quantité détectable par ce test.

Au vu de ces résultats, même si le *promoteur T7* est décrit comme quelque peu "leaky" selon la fiche technique du fournisseur, l'expression d'une protéine dont le gène est cloné en aval de ce promoteur dans le cadre de la complémentarité ne sera assurément pas optimale pour assurer une croissance de la souche SM2-1 complémente. Ceci indique que la présence de la T7 RNA polymérase est obligatoire pour la transcription des gènes clonés dans le plasmide pET28b(+). Par la suite, ce même test colorimétrique servira pour vérifier la synthèse et l'activité catalytique de la T7 RNA polymérase. Pour la complémentarité de la souche SM2-1, il faudra donc apporter le gène *T7 RNA polymérase* via un plasmide tel que le pAR1219.

Le plasmide pAR1219 contient le gène de la T7 RNA polymérase, sa co-expression en présence des constructions *CGI-58* clonées dans le vecteur pET28b(+) peut être une solution pour la complémentarité. Or ces deux plasmides ont la même origine de répllication pMB1 soulevant la question de leur incompatibilité potentielle. Deux plasmides avec la même

origine de répllication ne peuvent pas se maintenir en théorie dans une même cellule, toutefois, ici, les deux plasmides pET28b(+) et pAR1219 confèrent chacun une résistance à un antibiotique différent (kanamycine (KanR) et ampicilline (AmpR)) respectivement, de plus, ces deux plasmides étant présents chacun individuellement à environ 15 copies par cellule, l'utilisation de deux antibiotiques (chacun spécifique à un plasmide) pourrait permettre leur maintien dans les cellules par pression de sélection.

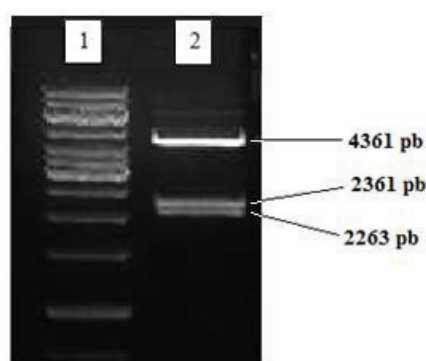
Afin de tester cette hypothèse, le même stagiaire, Yani Arhab a fait plusieurs tests de compatibilités, et il a montré (résultats non présentés) que c'était possible d'obtenir ces deux plasmides au sein d'une même cellule, mais le maintien des deux est impossible après plusieurs générations en raison de leur incompatibilité avérée. Il a fallu donc trouver un autre moyen de faire coexister les constructions des gènes *CGI-58* avec la protéine T7 RNA polymérase.

#### 4.1.2. Clonage de la *T7 RNA polymérase* dans le plasmide pACYC184 :

Il fallait donc un plasmide dont l'origine de répllication soit différente de celle du plasmide pET28b(+), or le plasmide pACYC184 possède l'origine de répllication *p15A*. Celle-ci est compatible avec l'origine de répllication pMB1 du plasmide pET28b(+).

La manipulation, faite par Yani Arhab, a donc consisté à cloner le gène de la T7 RNA polymérase, issu du plasmide pAR1219, dans le plasmide pACYC184.

Le plasmide pAR1219 contenant le gène de la T7 RNA polymérase sous la dépendance du promoteur *lacUV5* a été digéré par l'enzyme de restriction BamHI. Ceci a libéré deux fragments non distinguables de même taille (4 kb), l'un contenant la *T7 RNA polymérase* avec *lacUV5* et l'autre contenant le reste du plasmide. Ce second fragment a été par la suite digéré de manière simultanée par l'enzyme PciI afin de le distinguer sur gel d'agarose (**Figure 64, piste 2**). Le fragment de la *T7 RNA polymérase* a été alors découpé sous lampe UV et purifié.



**Figure 64** : Digestion du plasmide pAR1219 par les enzymes BamHI et PciI. **Piste 1** : marqueur de taille moléculaire (1 kb *DNA ladder*) ; **piste 2** : plasmide pAR1219 digéré par BamHI et PciI. Le fragment à 4361 pb correspond à la T7 RNA polymérase + promoteur *lacUV5*, digérés par BamHI. Les deux fragments à plus de 2 kb correspondent au reste du plasmide digéré par PciI.

Afin d'éviter au maximum une re-ligation spontanée sans intégration de l'insert, le plasmide digéré a été déphosphorylé. L'insert contenant *T7 RNA polymérase* s'intègre dans le site BamHI du plasmide pACYC184 situé au milieu du gène de résistance à la tétracycline.



En intégrant le gène de la T7 RNA polymérase, la résistance à la tétracycline doit être perdue. Le produit de ligation a été transformé dans des cellules Top10 électrocompétentes et la sélection des recombinants s'effectue sur milieu LB contenant du chloramphénicol puis les clones sont repiqués sur deux matrices : la première matrice contient du chloramphénicol et de la tétracycline (sur laquelle ne pousseront que des transformants issus de la re-circularisation du vecteur sur lui-même), la seconde contient du chloramphénicol (sur laquelle doivent pousser tous les clones, clones ayant intégré l'insert dans le plasmide et clones issus de la re-circularisation) (**Figure 65**).



**Figure 65** : Repiquage sur matrice des transformants 1 à 24 issus du clonage du fragment *T7 RNA polymérase* et promoteur *lacUV5* dans le plasmide pACYC184 digéré par l'enzyme BamHI. **Matrice 1** : milieu LB avec chloramphénicol ; **Matrice 2** : milieu LB avec chloramphénicol et tétracycline.

Les clones 2, 13, 18, 20 et 22 étaient capables de pousser sur la deuxième matrice (**Figure 65, matrice 2**), ils sont donc résistants à la tétracycline. En effet l'insertion s'effectuant normalement dans le gène *tetC*, ces clones n'ont donc pas intégré le gène de la T7 RNA polymérase dans le plasmide pACYC184. Les autres clones sensibles à la tétracycline sont susceptibles d'avoir intégré l'insert puisqu'ils ont perdu la résistance à cet antibiotique. Les clones 1 à 6 ont été testés pour la présence de l'insert par PCR en utilisant la couple d'amorces spécifiques de la *T7 RNA polymérase* (AN216 et AN217) qui amplifie un fragment de 250 pb.

Une seconde vérification de l'insert a été effectuée par digestion. De manière à s'assurer de la bonne insertion du gène de la T7 RNA polymérase dans le plasmide pACYC184, nommé pYAT7 par la suite, l'ADN plasmidique a été amplifié, purifié puis celui-ci a été digéré par des enzymes de restrictions pour vérifier son profil de restriction. Les résultats de ces tests faits par Yani Arhab ne sont pas présentés.

La présence du gène de la *T7 RNA polymérase* a été donc vérifiée dans ce plasmide à l'endroit où le plasmide a été digéré pour la ligation. Un test d'activité enzymatique est cependant nécessaire afin de prouver la fonctionnalité de l'enzyme T7 RNA polymérase avec son promoteur dans le plasmide.

#### 4.1.3. Test d'activité enzymatique de l'enzyme T7 RNA polymérase :

Le test colorimétrique décrit dans la partie précédente (cf. 4.1.1) a été de nouveau effectué ici. Les cellules Top10 ont été transformées avec le plasmide pET28b(+) contenant la laccase de *Bacillus subtilis* CotA et le plasmide pYAT7 (**Figure 66**).



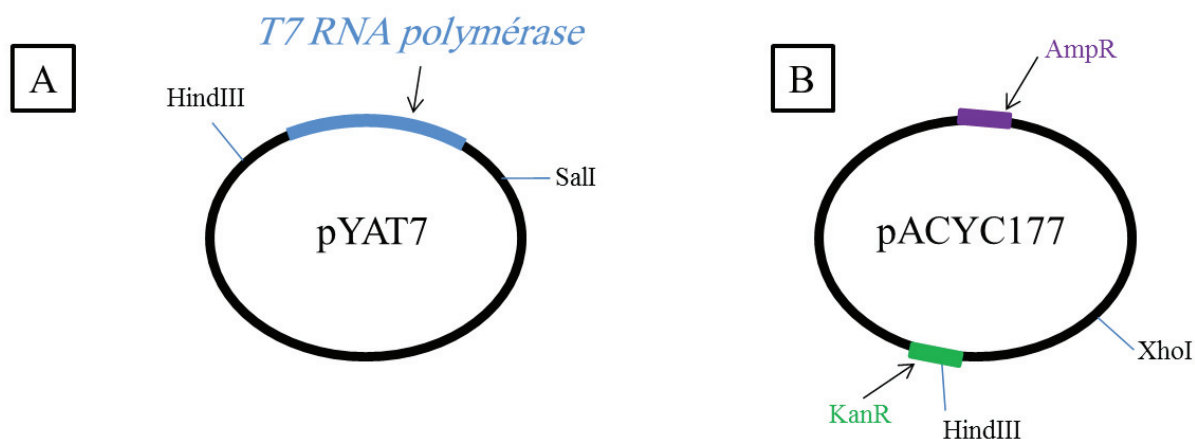


**Figure 66 :** Criblage de l'activité enzymatique de la T7 RNA polymérase par oxydation de l'ABTS avec la laccase CotA dans les cellules Top10. **Partie 1 :** cellules Top10 / pYAT7 / pET28b-*vide* ; **Partie 2 :** cellules Top 10 / pYAT7 / pET28b-*CotA*.

La coloration du milieu de culture en rouge (partie 2) indique que l'ABTS a été oxydé, ceci témoigne de la présence de la protéine CotA responsable de cette oxydation et donc de sa bonne transcription depuis le plasmide pET28b(+). Le gène étant sous la dépendance du *promoteur T7*, celui-ci est activé par la T7 RNA polymérase. L'activité de cette dernière est donc effective.

#### 4.1.4. Plasmide pAKT7 :

Un autre plasmide exprimant la T7 RNA polymérase a été synthétisé par mes soins en insérant le gène de la T7 RNA polymérase, issu du plasmide pYAT7 (**Figure 67 A**), dans la cassette de résistance à la kanamycine du plasmide pACYC177 (**Figure 67 B**), le plasmide résultant exprimant la T7 RNA polymérase et appelé pAKT7, est donc résistant à l'ampicilline. Ce plasmide a été fait pour l'expression de la T7 RNA polymérase dans les souches résistantes au chloramphénicol où le pYAT7 ne peut être utilisé.



**Figure 67 :** Représentation schématique des deux plasmides pYAT7 (**A**) et pACYC177 (**B**) avec l'emplacement des sites de restriction utilisés pour la formation du plasmide pAKT7. AmpR : cassette de résistance à l'ampicilline ; KanR : cassette de résistance à la kanamycine.

En premier lieu, nous avons vérifié si le plasmide pYAT7 contient bien un seul exemplaire des sites de restriction *HindIII* et *SalI*, pour cela 200 ng de plasmide pYAT7 ont été incubés soit avec l'enzyme *HindIII* seule ou l'enzyme *SalI* seule, soit avec les deux enzymes en même temps, pour voir le nombre de fragment obtenus après digestion ; le profil de restriction (résultat non présenté) analysé par électrophorèse sur gel agarose a montré la

présence d'un seul exemplaire des sites *HindIII* et *Sall*. Ensuite, le plasmide pACYC177 a été digéré par *HindIII* / *XhoI* libérant ainsi deux fragments, l'un de 3400 pb contenant le gène de résistance à l'ampicilline et l'autre de 520 pb, alors que le plasmide pYAT7 a été digéré par *HindIII* / *Sall* (les deux sites de restriction *Sall* et *XhoI* sont compatibles), libérant donc deux fragments, un de 5000 pb contenant le gène *T7 RNA polymérase* et l'autre de 3500 pb. Les deux grands fragments issus de la digestion de chaque plasmide ont été ensuite purifiés et liés par la T4 DNA ligase. Le plasmide résultant (pAKT7) a été ensuite transformé dans la souche Top10 électrocompétente puis sélectionné sur milieu LB avec ampicilline, et un criblage par PCR (utilisant le couple d'amorce AN216 et AN217) des transformants a été fait pour vérifier la présence du gène de la T7 RNA polymérase. Le plasmide pAKT7 a été ensuite purifié par midi-préparation et vérifié par séquençage. La carte du plasmide est présentée dans la partie Matériel et Méthodes (I.1).

#### **4.2. Clonage des gènes *plsC* des souches BL21 et SM2-1 :**

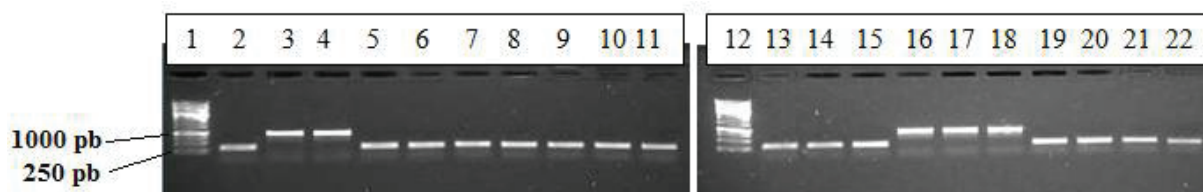
Le clonage des gènes *plsC* de type sauvage ou muté dans le plasmide pET28b(+) a un triple objectif. Tout d'abord ces clonages vont permettre de vérifier la mutation décrite dans la littérature en soumettant les constructions à un séquençage. Ensuite, ceci doit servir à compléter le mutant SM2-1 afin de vérifier que son phénotype (croissance sensible à la température) peut être complété par le gène *plsC*. Enfin, l'obtention d'une copie du gène sauvage dans un plasmide permettra d'effectuer la disruption de ce gène dans le chromosome bactérien par recombinaison homologue, pour créer un mutant stable utilisable pour des expériences de criblage.

##### **4.2.1. Clonage des gènes *plsC* muté ou sauvage dans le plasmide pET28b(+) :**

Les gènes *plsC* sauvage (souche BL21) et muté (souche SM2-1) ont été obtenus par la méthode de PCR avec des amorces spécifiques comportant les sites de restrictions *NcoI* et *NotI* à leur extrémité 5' (**voir Tableau S1 Annexe**). A partir de l'ADN génomique de la souche sauvage BL21 ou de la souche mutée SM2-1, un produit de PCR à environ 750 pb a été amplifié, les fragments obtenus ont été digérés par les enzymes correspondantes et une ligation a été effectuée dans le plasmide pET28b(+) lui-même digéré par ces enzymes et déphosphorylé. Ces constructions ont été ensuite transformées dans des cellules de la souche Top10 électrocompétentes puis sélectionnées sur milieu LB avec kanamycine. Afin de discriminer les clones ayant intégré l'insert des clones issus de la re-ligation du plasmide sur lui-même, 20 transformants ont été mis en culture dans 1 mL de LB avec kanamycine avant d'être criblés par PCR pour la présence de l'insert.

##### **4.2.2. Criblage des transformants :**

Les 20 clones ont été testés pour la présence de l'insert dans le plasmide pET28b(+) par PCR avec les amorces spécifiques du *promoteur* et du *terminateur T7* (AN216 et AN217) (**Figure 68**).



**Figure 68 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR sur des transformants issus de la ligation entre le vecteur pET28b(+) et le gène *plsC* sauvage ou muté. **Pistes 1 et 12 :** marqueur de taille moléculaire (1 kb DNA ladder) ; **pistes 2 à 6 et 13 à 17 :** produits de PCR de la ligation du gène *plsC* sauvage dans le plasmide pET28b(+) ; **pistes 7 à 11 et 18 à 22 :** produits de PCR de la ligation du gène *plsC* muté dans le plasmide pET28b(+).

Les bandes nucléotidiques présentes à 250 pb (**Figure 68**) indiquent l'absence d'insertion au niveau des sites de clonage. On observe cependant des produits d'amplification à environ 1000 pb dans les pistes 3, 4, 16, 17 et 18 (**Figure 68**). Cette bande correspond à l'insertion du gène *plsC* entre le *promoteur* T7 et le *terminateur* T7. Pour ces clones, le gène a donc été correctement cloné dans le plasmide pET28b(+). Nous avons donc ainsi obtenu la version du gène *plsC* sauvage issu de la souche BL21, et sa version mutée issue de la souche SM2-1. Les plasmides des clones des pistes 3 et 18 ont été amplifiés puis purifiés par midi-préparation.

#### 4.2.3. Séquençage et alignement :

Le plasmide pET28b-*plsC* dans ses deux versions (sauvage et muté) a été soumis à un séquençage afin de vérifier la présence de la mutation ponctuelle pour le gène de la souche SM2-1 décrit par Coleman *et al.* (Coleman *et al.* 1990) et les différences entre le gène sauvage de la souche BL21 et la souche DH10B. Ainsi les séquences ont été alignées contre la séquence théorique du gène *plsC*, conservée dans les bases de données, obtenue à partir de la souche DH10B d'ascendance K12 (**Figure 69**).

Au début des séquences nucléiques se trouve le site de restriction *NcoI* (C/CATGG) apporté par les amorces de PCR pour des raisons de contraintes de clonage. Dans ce site de restriction, la sixième base, celle située après le codon *start* ATG, est donc une Guanine en lieu et place d'une Cytosine dans la séquence de la souche DH10B. Ceci implique un changement de codon du deuxième acide aminé CTA→GTA et donc un changement d'acide aminé de Leucine à Valine (**Figure 69**). Ces deux acides aminés ont des propriétés biochimiques et un encombrement stérique très voisins.

Dans le type sauvage, une seule mutation T59A existe entre la séquence protéique de BL21 et la séquence théorique (**Figure 69**). Dans l'éventualité où cette mutation serait due à une erreur de l'ADN polymérase lors de l'amplification par PCR, la protéine pourra potentiellement avoir une activité enzymatique modifiée. Afin de vérifier cette possibilité, une recherche dans les banques de données de souches d'*E. coli* a été effectuée en utilisant le programme BLAST (serveur PubMed). Le résultat de cette recherche a montré que la majorité des séquences possèdent la mutation T59A. La séquence obtenue pourra donc être utilisée pour la suite des expériences.

Dans le type muté, une seule mutation (G116A) a été observée entre la séquence nucléotidique sauvage et la séquence mutée du gène *plsC*. Cette mutation implique un

changement de résidu G39E qui est celui décrit dans la littérature (Coleman *et al.* 1990) et considéré comme responsable du phénotype de la souche SM2-1. Ces résultats confirment les produits en notre possession et valident leur utilisation pour la suite.

	10	20	30	40	50	60
Séquence wt BL21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	MVYIFRLIITVIYSILVCFVSGSIYCLFSPRNPKHVATF	GHMFGRLAPLFLGLKVECRKPAD			
Séquence théorique	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	MLYIFRLIITVIYSILVCFVSGSIYCLFSPRNPKHVATF	GHMFGRLAPLFLGLKVECRKPTD			
Séquence mutant SM21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	MVYIFRLIITVIYSILVCFVSGSIYCLFSPRNPKHVATF	GHMFGRLAPLFLGLKVECRKPAD			
	70	80	90	100	110	120
Séquence wt BL21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	AESYGNAIYIANHQNNYDMVTASNIVQPPTVTVGKKSLLWIPFFGQLYWLTGNLLIDRNN				
Séquence théorique	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	AESYGNAIYIANHQNNYDMVTASNIVQPPTVTVGKKSLLWIPFFGQLYWLTGNLLIDRNN				
Séquence mutant SM21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	AESYGNAIYIANHQNNYDMVTASNIVQPPTVTVGKKSLLWIPFFGQLYWLTGNLLIDRNN				
	130	140	150	160	170	180
Séquence wt BL21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTKAHGTIAEVVNHFKKRRISIMWFPEGTRSRGRGLLPFGTAFHAAIAAGVPIIPVCVS				
Séquence théorique	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTKAHGTIAEVVNHFKKRRISIMWFPEGTRSRGRGLLPFGTAFHAAIAAGVPIIPVCVS				
Séquence mutant SM21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	RTKAHGTIAEVVNHFKKRRISIMWFPEGTRSRGRGLLPFGTAFHAAIAAGVPIIPVCVS				
	190	200	210	220	230	240
Séquence wt BL21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TTSNKINLNLRLHNGLVIVEMLPIDVSQYQKDQVRELAHCRSIMEQKIAELDKEVAERE				
Séquence théorique	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TTSNKINLNLRLHNGLVIVEMLPIDVSQYQKDQVRELAHCRSIMEQKIAELDKEVAERE				
Séquence mutant SM21	..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TTSNKINLNLRLHNGLVIVEMLPIDVSQYQKDQVRELAHCRSIMEQKIAELDKEVAERE				
	.....					
Séquence wt BL21	AAGKV*					
Séquence théorique	AAGKV*					
Séquence mutant SM21	AAGKV*					

**Figure 69 :** Alignement des séquences peptidiques (logiciel BioEdit) obtenues à partir du gène *plsC* sauvage de la souche BL21 (*wt*) et *plsC* muté de la souche SM2-1 contre la séquence théorique obtenue à partir de la souche DH10B. Les différences sont indiquées en rouge.

#### 4.3. Test *in vivo* de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 dans la souche SM2-1 :

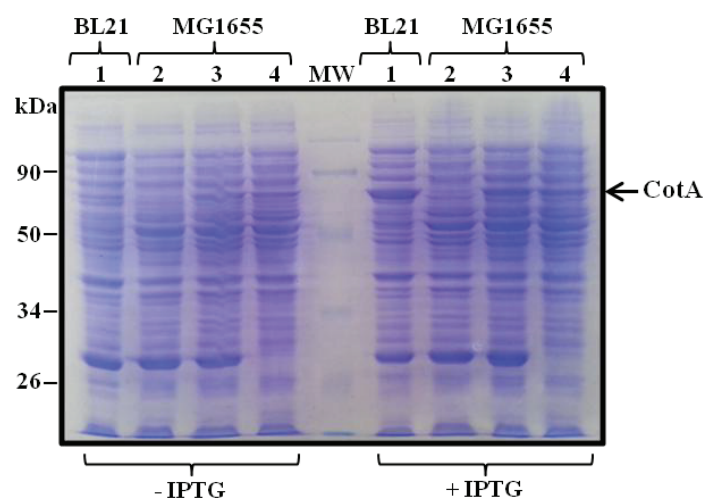
Nous avons mis en place tous les outils pour tester l'activité LPAAT *in vivo* de la protéine CGI-58 et on a voulu, dans un premier temps, tester si le système marchait bien pour l'enzyme *plsC*, qui servira de contrôle positif pour la complémentation de la souche SM2-1. On a alors testé si l'expression de la protéine *plsC* dans la souche SM2-1 permettait à cette dernière de pousser à 42°C, pour qu'on puisse tester par la suite l'effet de l'expression de la protéine CGI-58.

##### 4.3.1. Vérification du bon fonctionnement du système de complémentation de la souche SM2-1 :

La transformation de la souche SM2-1 mutante pour le gène *plsC* par les deux plasmides pYAT7 et pET28b-*plsC* permettra de vérifier si la complémentation de l'activité LPAAT déficiente est possible par l'apport du gène *plsC* sauvage.

Dans un premier temps on a voulu tester si ce système permet bien l'expression de la protéine recombinante avant de tester la complémentation à 42°C. Pour cela, deux souches, MG1655, souche sauvage d'*E. coli* n'exprimant pas la T7 RNA polymérase, et la souche BL21(DE3), qui exprime la T7 RNA polymérase, ont été transformées par les plasmides

pET28b-*CotA* ou pET28b-vide, la souche MG1655 ayant été préalablement transformée par le plasmide pYAT7 ou pAKT7. L'expression de la protéine recombinante a été vérifiée par SDS-PAGE (**Figure 70**).



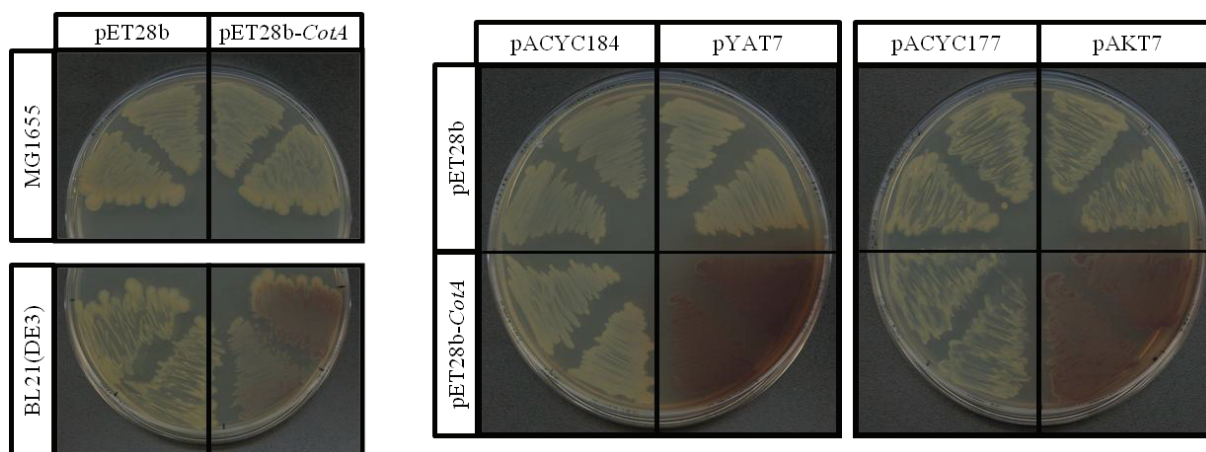
**Figure 70** : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine recombinante, issue de la construction pET28b-*CotA*, dans les souches MG1655 [déficiente en T7 RNA polymérase] et BL21(DE3). Les protéines totales ont été analysées avant et après induction à l'IPTG pendant 3h. **Piste 1** : souche BL21 transformée par le plasmide pET28b-*CotA* ; **piste 2** : souche MG1655 transformée par le plasmide pET28b-vide et pYAT7 ; **piste 3** : souche MG1655 transformée par le plasmide pET28b-*CotA* et pYAT7 ; **piste 4** : souche MG1655 transformée par le plasmide pET28b-*CotA* et pAKT7. **MW** : marqueur de masse moléculaire.

On ne peut voir une expression de la protéine CotA qu'après induction à l'IPTG dans le control positif BL21 (**Figure 70, piste 1**), et dans la souche MG1655 transformé par pYAT7 ou pAKT7 et pET28b-*CotA* (**Figure 70, piste 3 et 4**), on ne voit pas d'expression pour la souche MG1655 transformée par pYAT7 et pET28b-vide (**Figure 70, piste 2**). Cela vérifie le bon fonctionnement du système et montre l'expression de la protéine recombinante apportée par le plasmide pET28b(+) dans n'importe quelle souche déficiente en T7 RNA polymérase qui est apportée par le plasmide pYAT7 ou le plasmide pAKT7.

Un autre contrôle a été effectué pour vérifier ce système d'expression, en utilisant l'activité de la protéine CotA capable d'oxyder l'ABTS présent dans le milieu de culture et la détection du produit de la réaction par dosage colorimétrique. Les deux souches BL21 et MG1655 ont été à nouveau utilisées, et transformées par les mêmes plasmides pYAT7 ou pAKT7 et pET28b-vide ou pET28b-*CotA* comme indiqué dans la **figure 71**.

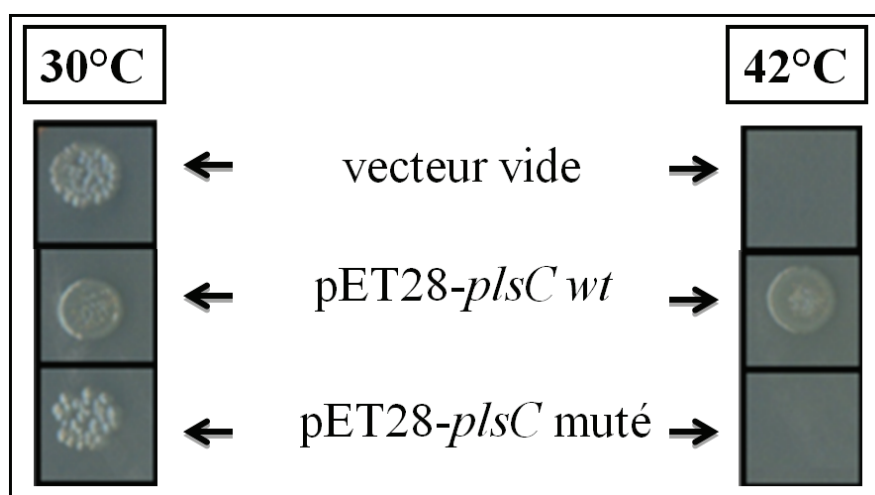
D'après la **figure 71**, on remarque que la coloration n'est présente qu'en présence conjointe de la T7 RNA polymérase (apportée soit par la souche BL21(DE3) soit dans la souche MG1655 par le plasmide pYAT7 ou pAKT7) et de la protéine CotA apportée par le plasmide pET28b-*CotA*. Ces résultats démontrent le bon fonctionnement du système d'expression.





**Figure 71** : Test d'expression et d'activité enzymatique de la protéine CotA dans les souches MG1655 et BL21(DE3) par coloration du milieu LB agar suite à l'oxydation de l'ABTS par la protéine CotA. La présence de la coloration indique une expression de la protéine. Les milieux LB contiennent 250  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$ , 1 mM d'ABTS et 1  $\mu$ M d'IPTG. Les photos ont été prises après 3 jours d'incubation.

L'étape suivante était donc de tester si l'apport de la protéine *plsC* complémente la souche SM2-1 en restaurant la croissance à 42°C. On a donc transformé la souche SM2-1 par le plasmide pYAT7 dans un premier temps, puis par les constructions pET28b-*plsC* wt (wild-type) ou pET28b-*plsC* muté ou par le plasmide pET28b-vide, puis nous avons testé la croissance à 30° et à 42°C de la souche, sur boîte LB agar en présence de l'IPTG et des antibiotiques adaptés en déposant des cultures liquides diluées (**Figure 72**).



**Figure 72** : Test de croissance à 30° et 42°C, sur boîte LB agar en présence de 100  $\mu$ M d'IPTG, de la souche SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et différentes versions du plasmide pET28b(+) (vide ou contenant *plsC* wt ou *plsC* muté). La présence de la tache au niveau du gel indique la croissance de la bactérie, et donc la complémentation de la souche. *wt* : phénotype sauvage.

On peut voir d'après la **figure 72** que l'apport de la protéine *plsC* sauvage dans la souche SM2-1 a permis la croissance de la souche à 42°C, cela vérifie bien le bon fonctionnement du système d'expression, et que l'apport d'une enzyme à activité LPAAT permet la complémentation de la souche mutée. Les différentes constructions CGI-58 clonées dans le plasmide pET28b(+) ont donc pu être testées.





montre également que *in vivo* la protéine *MmCGI-58* n'a pas d'activité LPAAT, ce qui vient confirmer le résultat de l'équipe du Pr. Brasaemle (McMahon *et al.* 2014). De plus, on montre ici que la protéine *AtCGI-58* n'est pas capable de compléter la souche SM2-1, et donc ne possède pas d'activité LPAAT comme la protéine murine. Ces résultats remettent en question l'activité LPAAT observée dans cette étude (cf. 3.3) par analyse par spectrométrie de masse de l'activité enzymatique, et l'activité observée par l'équipe de Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.* 2009). Cette activité, pour les CGI-58 de plantes, comme dans le cas de la protéine *MmCGI-58*, pourrait être due à un contaminant qui est probablement la protéine *plsC* de la souche BL21(DE3), contaminant décrit par McMahon *et al.* (McMahon *et al.* 2014). Cette hypothèse remet également en question les deux autres activités, TG lipase et phospholipase, démontrées par l'équipe de Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.* 2009) pour la protéine *AtCGI-58*, ces deux activités seront donc réexaminées par la suite.

Pour renforcer le résultat que la protéine *AtCGI-58* est dépourvue d'activité LPAAT, un autre type de complémentation a été testé en utilisant cette même souche SM2-1, mais cette fois ci cultivée en présence de cuivre.

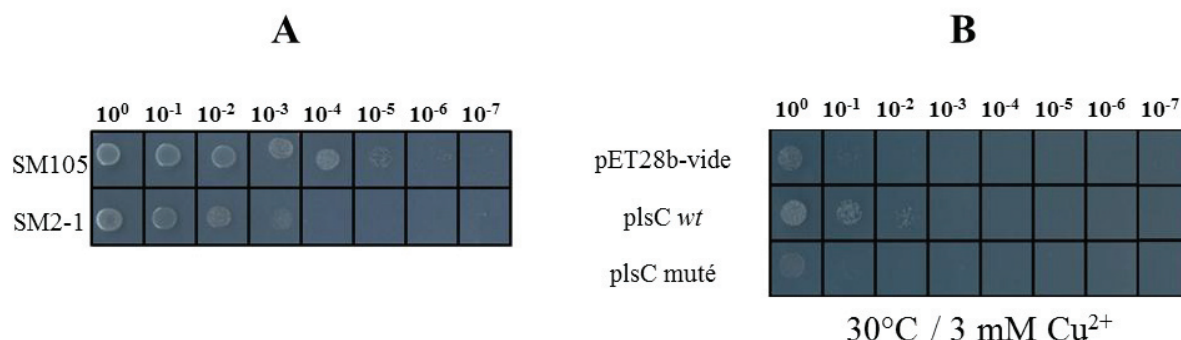
#### **4.3.2.2. Vérification *in vivo* de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par complémentation en présence de cuivre :**

Il était montré (Entian *et al.* 1999) qu'une mutation de l'enzyme ICT1 (*increased copper tolerance 1*), l'homologue de la protéine CGI-58 chez les levures et qui décrite comme possédant une activité LPAAT (Ghosh *et al.* 2008), augmente la sensibilité au cuivre. Nous avons donc eu l'idée d'utiliser la relation entre l'activité LPAAT et la sensibilité au cuivre pour tester l'activité LPAAT potentielle de la protéine CGI-58. La souche SM2-1, vu qu'elle est mutée dans le gène *plsC* codant une enzyme à activité LPAAT, pourrait être sensible au cuivre. On a donc testé, dans un premier temps, si la souche SM2-1 était véritablement sensible au cuivre, puis nous avons testé, par la suite, si la transformation de cette souche par la construction pET28b-*plsC* augmente la tolérance de la souche au cuivre, pour à la fin pouvoir utiliser ce système pour le criblage de l'activité LPAAT potentielle de la protéine CGI-58.

Pour tester l'effet du cuivre sur la souche SM2-1, nous avons donc fait pousser la souche SM2-1 ainsi que la souche sauvage SM105 à 30°C sur milieu solide LB agar en présence de différentes concentrations de cuivre allant de 0 à 3,3 mM. Nous avons remarqué qu'une concentration de 3 mM de cuivre était sans effet sur la croissance de la souche sauvage SM105 mais inhibait totalement la croissance de la souche mutée SM2-1 (**Figure 74 A**). Nous avons donc utilisé cette concentration de 3 mM de cuivre pour toutes les expériences suivantes.

Ce test nous a permis de démontrer, pour la première fois, une relation directe entre la synthèse de PA par la protéine *plsC*, enzyme à activité LPAAT d'*E. coli*, et la sensibilité au cuivre. Un rôle du PA dans la résistance à la vancomycine a été déjà rapporté (Sutterlin *et al.* 2014) ; les auteurs montrent dans cette publication que l'augmentation des niveaux du PA augmente la résistance d'*E. coli* à la vancomycine, les auteurs suggèrent que l'augmentation des niveaux de PA change les propriétés physiques et la perméabilité de la membrane externe

des bactéries, ce qui empêche la pénétration de la vancomycine dans le périplasme. On peut donc supposer un même rôle du PA dans la résistance au cuivre.



**Figure 74 :** Vérification sur milieu solide de l'effet du cuivre sur la croissance de la souche SM2-1 exprimant ou non la protéine plsC.

**A :** Croissance à 30°C sur boîte LB agar en présence de 3 mM de cuivre et 100 µM d'IPTG de la souche SM2-1 et de la souche SM105. Une série de dilution de  $10^0$  à  $10^{-7}$  a été effectuée à partir d'une culture de chaque souche. La présence de la tache indique la croissance de la bactérie. **SM105 :** souche sauvage ; **SM2-1 :** souche mutée.

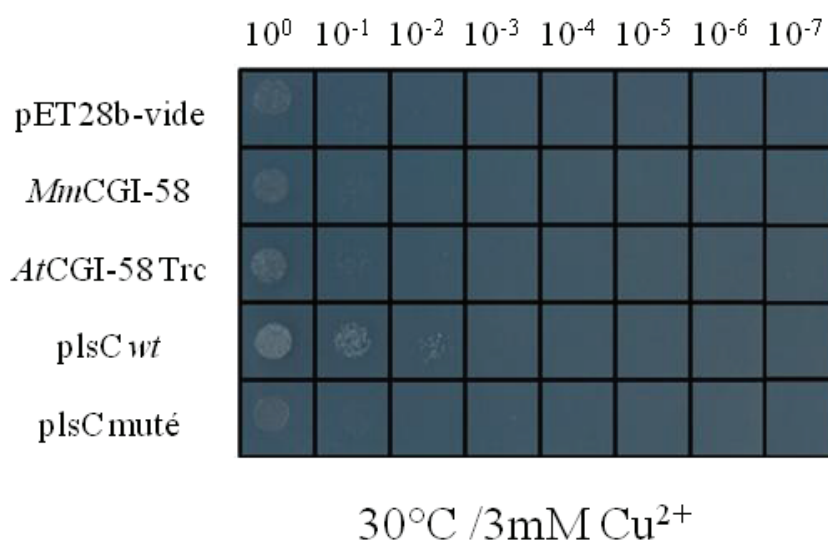
**B :** Croissance sur boîte LB agar en présence de 3 mM de cuivre et 100 µM d'IPTG à 30°C de la souche SM2-1 contenant le plasmide pYAT7 et les différentes constructions indiquées. Une série de dilution de  $10^0$  à  $10^{-7}$  a été réalisée à partir d'une culture de chaque transformant. La présence de la tache indique la croissance de la bactérie. **pET28b-vide :** SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le vecteur vide servant de contrôle négatif ; **plsC wt :** SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le plasmide pET28b-*plsC wt* ; **plsC muté :** SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le plasmide pET28b-*plsC muté*.

L'étape suivante était alors de vérifier si la transformation par le gène sauvage *plsC* dans la souche SM2-1 permettait la survie de la souche en présence de la même concentration de de cuivre (3 mM). La souche SM2-1 contenant le plasmide pYAT7 a été transformée par le plasmide pET28b-*plsC wt* ou le plasmide pET28b-*plsC muté* ou le plasmide pET28b-vide, et la croissance a été étudiée sur boîte LB agar à 30°C en présence de 3 mM de cuivre et de 100 µM d'IPTG (**Figure 74 B**).

On remarque donc que la transformation par la construction permettant l'expression de la protéine plsC sauvage renforce la tolérance de la souche SM2-1 au cuivre, ce qui indique qu'une protéine à activité LPAAT pourrait donc protéger la souche SM2-1 des effets délétères du cuivre. Ce système a donc été utilisé pour le criblage de l'activité LPAAT potentielle de la protéine CGI-58.

#### 4.3.2.2.1. Vérification *in vivo* de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par complémentation en présence de cuivre sur milieu solide :

On a donc testé l'effet de l'expression de la protéine CGI-58 dans la souche SM2-1 en présence de 3 mM de cuivre sur milieu LB agar (**Figure 75**).



**Figure 75 :** Vérification *in vivo* de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par complémentation en présence de cuivre sur milieu solide. La croissance de la souche SM2-1, contenant le plasmide pYAT7 et les différentes constructions indiquées, a été testée sur boîte LB agar en présence de 3 mM de cuivre et 100  $\mu$ M d'IPTG à 30°C. Une série de dilution de 10<sup>0</sup> à 10<sup>-7</sup> a été réalisée à partir d'une culture liquide de chaque transformant. La présence de la tache indique la croissance de la bactérie.

**pET28b-vide :** SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le vecteur vide servant de contrôle négatif ; ***Mm*CGI-58 :** souche SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le plasmide pET28b-*Mm*CGI-58 ; ***At*CGI-58 Trc :** souche SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le plasmide pET28b-*At*CGI-58 Trc ; **plsC wt :** souche SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le plasmide pET28b-*plsC* wt servant de contrôle positif ; **plsC muté :** souche SM2-1 transformée par le plasmide pYAT7 et le plasmide pET28b-*plsC* muté servant de contrôle négatif.

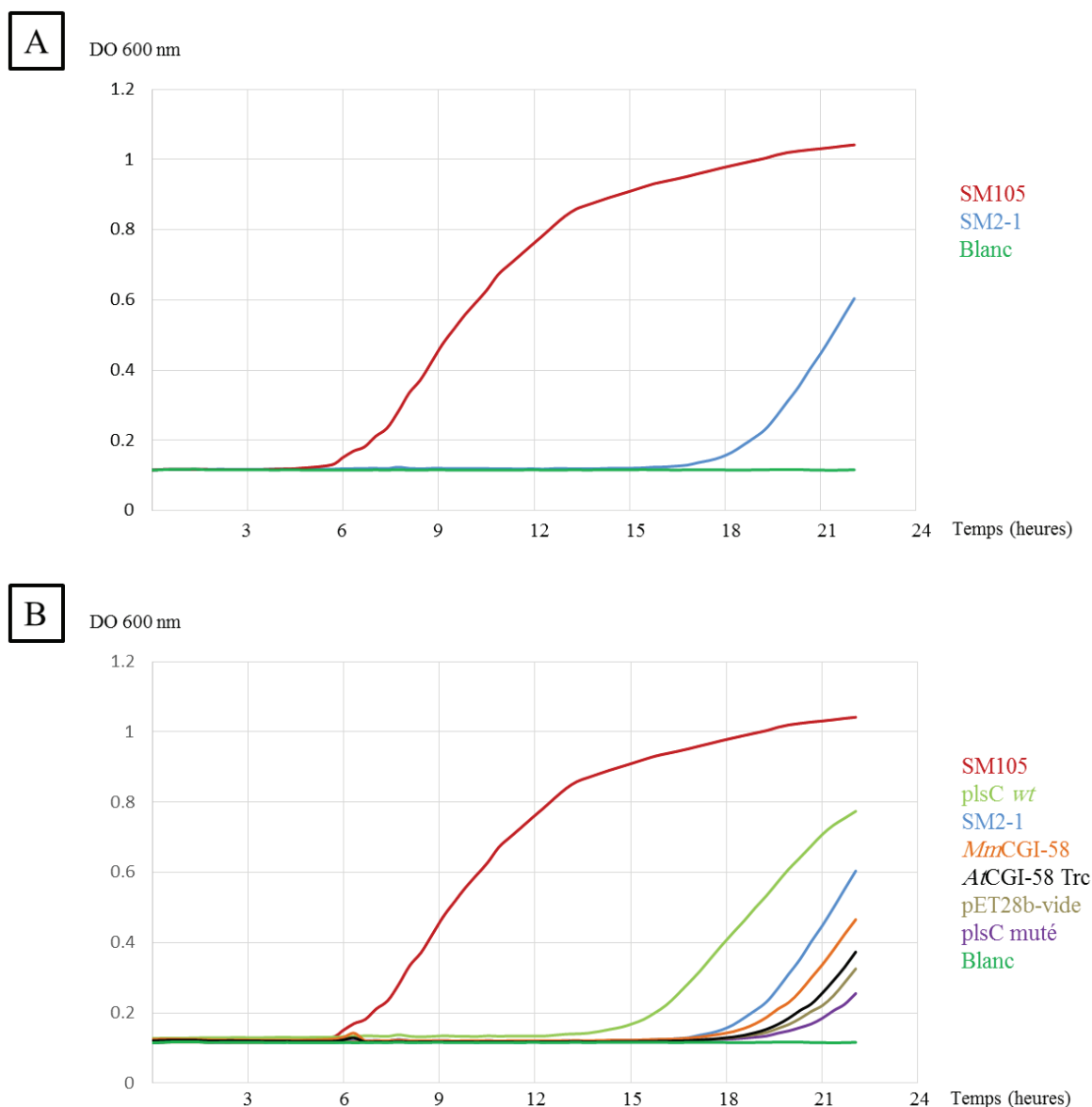
On remarque donc que la transformation par les constructions permettant l'expression de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* ou de souris n'a pas permis la complémentation de la souche SM2-1 ; on voit le même profil, comme pour le vecteur vide ou la construction pET28b-*plsC* muté, profil très différent de celui obtenu à l'aide du contrôle positif pET28b-*plsC* wt où l'on voit une croissance de la souche. L'ensemble de ces résultats confirme une nouvelle fois l'absence d'activité LPAAT pour les deux protéines CGI-58 d'*Arabidopsis* et murine dans ce système d'expression.

#### 4.3.2.2.2. Vérification *in vivo* de l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 par complémentation en présence de cuivre en milieu liquide :

On a testé aussi l'effet de cuivre, en milieu liquide, en suivant la croissance au cours du temps, et voir si on pouvait détecter un effet du cuivre sur la vitesse de croissance des différents transformants. La complémentation de la souche SM2-1 par la protéine CGI-58 a été donc testée en milieu LB liquide. Tout d'abord, nous avons remarqué qu'une concentration de 3 mM de cuivre était toxique en milieu liquide, même pour la souche sauvage, et donc une optimisation de la concentration optimale de cuivre a été réalisée préalablement, pour déterminer quelle concentration permettait de voir une différence de croissance entre la souche SM105 sauvage et la souche SM2-1 mutée.

On a remarqué qu'une concentration comprise entre 100 et 700  $\mu\text{M}$  de cuivre était nécessaire pour voir une différence de croissance entre les deux souches, sans être toxique pour la souche sauvage SM105 (**Figure 76 A**).

La tentative de complémentation de la souche SM2-1 par les protéines CGI-58 a été donc testée dans ces conditions. Une gamme de concentration de cuivre a été testée (0, 25, 50, 75, 100, 200, 400 et 800  $\mu\text{M}$ ) et la croissance a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm pendant 24 h à 30°C (**Figure 76 B**).



**Figure 76 :** Mesure de l'absorbance de la DO à 600 nm reflétant la croissance en milieu liquide, à 30°C et en présence de cuivre, de la souche SM105 et/ou de la souche SM2-1 exprimant ou non la protéine CGI-58.

**A :** Comparaison de la vitesse de croissance en présence de 400  $\mu\text{M}$  de cuivre de la souche SM2-1 par rapport à la souche SM105 sauvage. **SM105 :** souche sauvage ; **SM2-1 :** souche muté sans plasmide.

**B :** Effet de l'expression de la protéine plC ou de la protéine CGI-58 sur la croissance de la souche SM2-1 en présence de 400  $\mu\text{M}$  de cuivre. La souche a été transformée par le plasmide pYAT7 et les constructions indiquées. **pET28b-vide :** contrôle négatif ; **plC *wt* :** contrôle positif ; **plC muté :** contrôle négatif. **Blanc :** milieu de culture sans inoculation de bactérie.

On a remarqué en milieu liquide que, de même que sur milieu solide, les souches transformées par les constructions CGI-58, soit d'*Arabidopsis* soit de souris, n'ont pas mieux poussé en présence de cuivre que le contrôle négatif, et notamment par rapport à la souche transformée par la construction permettant l'expression de la protéine plsC sauvage (*wt*).

En conclusion de tous ces tests de complémentation *in vivo*, soit sur milieu solide à 42°C, soit en milieu liquide ou sur milieu solide en présence de cuivre, l'expression de la protéine CGI-58 murine ou d'*Arabidopsis thaliana* ne permettait pas la complémentation de la souche SM2-1. Ces résultats vont dans le même sens que ceux décrits dans la publication de McMahon *et al.* (McMahon *et al.* 2014), où ils sont montrés que l'activité LPAAT de la protéine CGI-58 murine était due à un contaminant obtenu lors de la purification de la protéine à partir de la souche dans BL21(DE3) ; ce contaminant est probablement à l'origine des résultats publiés pour la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis thaliana*.

Par contre, pour les deux autres activités TG lipase et phospholipase décrites pour la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis*, nous n'avons pas de preuve, comme dans le cas de l'activité LPAAT, que ces activités étaient dues à un contaminant qu'il s'agissait de véritables activités enzymatiques de la protéine CGI-58. Pour vérifier la présence ou l'absence de ces deux activités, on a voulu donc tenter deux approches :

- La première est de générer et tester des mutants catalytiques obtenus par mutagenèse dirigée du gène *AtCGI-58*, chose qui n'avait jamais été testée auparavant, et voir si on détectait une différence d'activité enzymatique entre la protéine sauvage et la protéine mutée.
- La seconde approche a été de purifier la protéine CGI-58 exprimée dans la souche SM2-1, dans ce cas, même si la protéine plsC est co-purifiée avec la protéine recombinante, elle ne posera pas de problème puisqu'elle est mutée et non fonctionnelle.

## 5. Mutagenèse dirigée des gènes *CGI-58* de souris et d'*Arabidopsis thaliana* :

Les mutations H329A, D334A, D303A, E262A, H84A, N155S et S117A ont été effectuées sur le gène *MmCGI-58* de souris, et les mutations S119N, H218A, H379A, D302, D384A, F258A et W184Y ont été effectuées sur le gène *AtCGI-58* d'*Arabidopsis thaliana* à l'aide d'amorces de PCR comportant la mutation nucléotidique désirée (voir **tableau S1** Annexe). Les mutations ciblent des acides aminés soit potentiellement impliqués dans les sites catalytiques potentiels (H329A, D334A, D303A, N155S, S199N, H379A, D302A, D384A) soit extrêmement conservés entre organismes (F258A, W184A, H84A, H218A) soit impliqués dans des cas pathologiques du syndrome de Chanarin-Dorfman (E262A, S177A). Les plasmides ont été tout d'abord méthylés par une méthylase, de cette façon, lors de la transformation des produits de PCR, seuls les ADN non méthylés issus de la PCR et comportant donc la mutation vont rester dans les cellules, en effet l'ADN méthylé sera dégradé par la souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1R lors de la transformation (cf. Matériel et Méthodes).

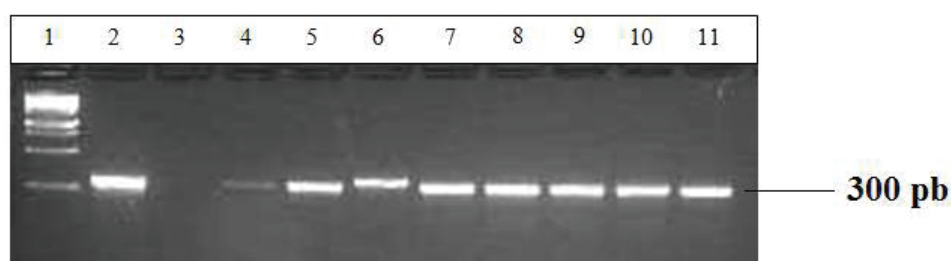


Le problème de cette technique de mutagenèse réside dans l'étape de recombinaison homologue de l'ADN linéaire amplifié en un plasmide circulaire, où des cas d'insertions multiples des amorces de PCR ont été observés. La vérification de l'absence de poly-insertions des amorces a été effectuée par PCR et la mutation a été vérifiée par séquençage de l'ADN plasmidique.

### 5.1. Criblage des polyinsertions :

Plusieurs clones de chaque mutant ont été testés pour la présence de poly-insertions avec des couples d'amorces permettant d'amplifier de manière spécifique un fragment du gène.

Pour les mutations H329A et D303A par exemple, le produit d'amplification théorique est de 300 pb (**Figure 77**).



**Figure 77** : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % de l'amplification spécifique d'un fragment de 300 pb chez les clones 1 à 4 des mutants H329A et D303A. **Piste 1** : marqueur de taille moléculaire (1 kb *DNA ladder*) ; **Piste 2** : témoin positif pET28b-*MmCGI-58* ; **piste 3** : témoin négatif (amplification sans ADN) ; **pistes 4 à 7** : mutants 1 à 4 H329A ; **pistes 8 à 11** : mutants 1 à 4 D303A.

La présence d'une bande nucléotidique avec une taille un peu plus élevée que 300 pb dans la piste 6 indique la présence d'une ou plusieurs poly-insertions. Les autres pistes où les mutants sont présents ont une bande nucléotidique à 300 pb correspondant à l'amplification spécifique des amorces de PCR. Dans ces pistes, il n'y a donc pas de poly-insertion des amorces. La même vérification a été effectuée pour tous les mutants, et des clones sans poly-insertions ont été sélectionnés.

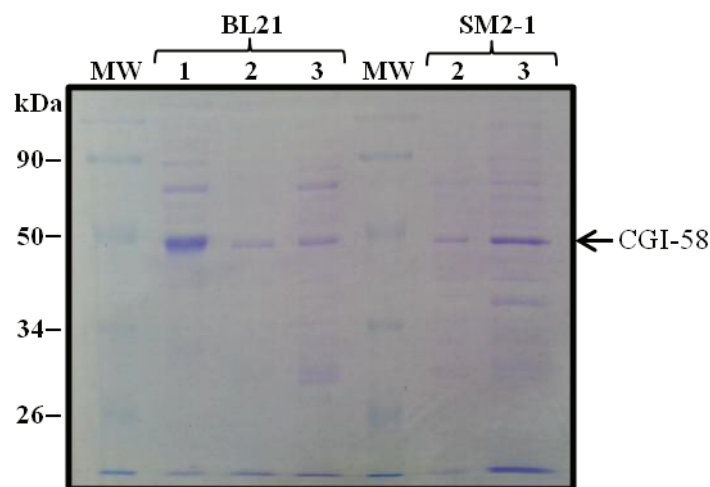
Afin de vérifier la présence de la mutation désirée, et uniquement celle-ci, les mutants sans poly-insertions sont soumis à un séquençage. Les résultats du séquençage indiquent que la mutagenèse dirigée s'est parfaitement déroulée, la mutation désirée est en place.

## 6. Tests d'activité *in vitro* de la protéine CGI-58, purifiée à partir de la souche SM2-1 d'*E. coli* :

Avant de tester les mutants catalytiques potentiels il fallait en premier lieu tester si on détectait une activité de la protéine CGI-58 sauvage d'*Arabidopsis* ou de souris purifiée à partir de la souche SM2-1 et/ou BL21(DE3).

C'est pour cela qu'une purification en condition native, suivant le même protocole déjà utilisé et optimisé pour la purification à partir de la souche BL21(DE3), en utilisant la résine

de cobalt, a été entreprise pour purifier la protéine *AtCGI-58* Trc ou FL à partir de la souche SM2-1. L'éluat final de la purification a été analysé par SDS-PAGE (**Figure 78**).



**Figure 78** : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine *AtCGI-58* Trc avec 6xHis en N-terminal, et de la protéine *AtCGI-58* FL avec 6xHis en N-terminal dans des conditions natives à partir de la souche SM2-1. Une bande protéique d'environ 45 kDa qui correspond à la protéine CGI-58 est observée dans l'éluat final (pistes 2 et 3). **Piste 1** : la protéine *MmCGI-58* ; **piste 2** : la protéine *AtCGI-58* Trc ; **piste 3** : la protéine *AtCGI-58* FL ; **(MW)** : marqueur de masse moléculaire. La flèche noire indique la protéine CGI-58.

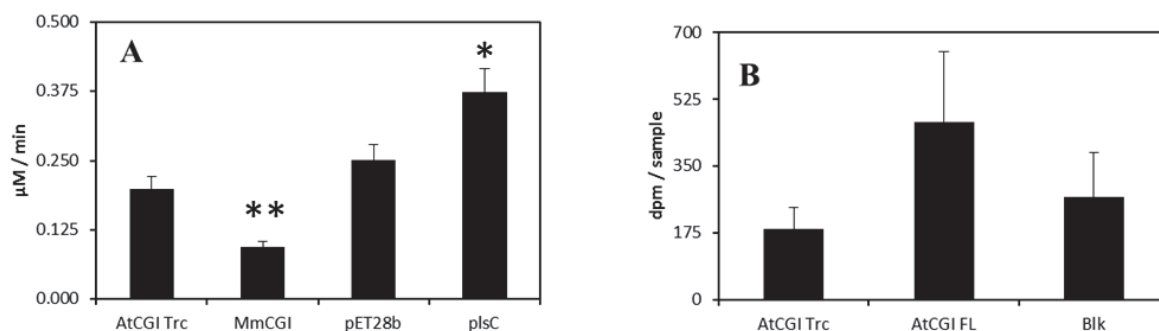
On voit bien la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* Trc (**Figure 78, piste 2**) et FL (**Figure 78, piste 3**), purifiée à partir de la souche SM2-1 et de la souche BL21. Ces protéines ont été utilisées pour tester les activités LPAAT, TG lipase et phospholipase *in vitro*.

A ce stade de la thèse, le laboratoire a recouvré la jouissance d'une salle de radioactivité, ce qui m'a permis de réaliser des tests enzymatiques en utilisant des substrats radiomarqués, ce qui est beaucoup plus sensible que les autres techniques déjà utilisées et ce qui permet de détecter même de très faibles activités catalytiques.

#### 6.1. Tests d'activité LPAAT de la protéine CGI-58, purifiée à partir de la souche SM2-1 :

Pour l'activité LPAAT, vu que l'on n'avait pas la protéine plsC sauvage (utilisée comme contrôle positif) purifiée, nous avons donc testé l'activité sur des extraits bruts issus de la souche SM2-1 exprimant les deux protéines CGI-58 d'*Arabidopsis* et de souris par comparaison à un contrôle positif exprimant la protéine plsC sauvage, et un autre contrôle, cette fois négatif, obtenu à partir de cellules transformées par le plasmide pET28b-vide. Nous avons également cherché à mesurer l'activité des deux protéines *AtCGI-58* Trc et FL purifiées à partir de la souche SM2-1.

Le test a été réalisé en présence des deux substrats oléoyl-LPA et oléoyl-CoA (radiomarqués) pendant 10 min en utilisant soit 5 µg de protéines totales pour les extraits bruts (**Figure 79 A**) soit 1 µg d'enzyme pour les fractions purifiées (**Figure 79 B**), et la quantité de PA formée a été mesurée.



**Figure 79 :** Mesure de l'activité LPAAT des différentes protéines recombinantes par dosage du PA formé.

**A :** Détermination de l'activité LPAAT par dosage du PA formé en utilisant 5 µg de protéine contenue dans l'extrait brut des cellules SM2-1 transformées soit par le pET28b (vecteur vide), soit par le pET28b permettant l'expression de la protéine *MmCGI*-58 (*MmCGI*), ou de la protéine *AtCGI*-58 Trc (*AtCGI Trc*), ou de la protéine *plsC*.

**B :** Détermination de l'activité LPAAT par comptage des dpm totaux issus de la fraction PA purifiée par CCM et obtenue après action de la protéine *AtCGI*-58 (1 µg).

Les différentes barres représentent la moyenne de triplicats ± l'écart type de tests enzymatiques obtenus pour chaque protéine. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  (par rapport au pET28b-vide).

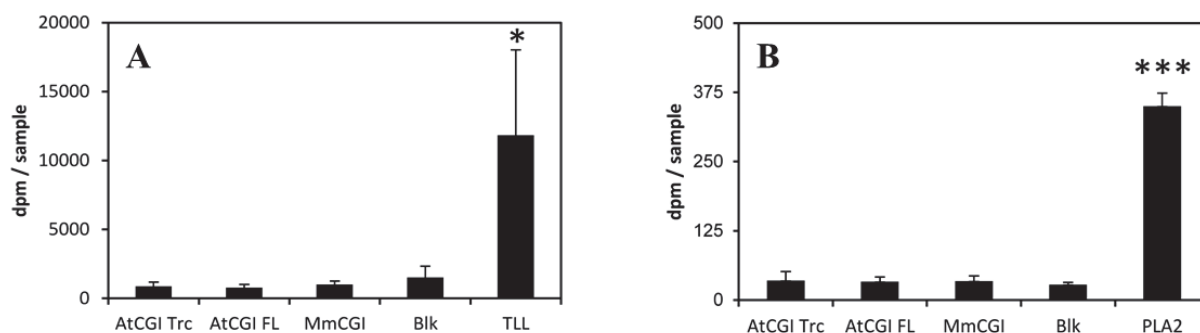
Encore une fois, nous revérifions l'absence d'activité LPAAT de la protéine *AtCGI*-58 Trc ou FL, cette fois testée à partir de protéine recombinante exprimée dans la souche SM2-1. Ces résultats renforcent le fait que l'activité déjà détectée soit dans ce travail de thèse par spectrométrie de masse, soit décrite par l'équipe Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.* 2009), pour la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* purifiée à partir de la souche BL21(DE3), n'était en fait qu'un artefact provoqué par la contamination par la protéine *plsC* de la fraction protéique purifiée. Les valeurs de PA détectées en utilisant des extraits bruts (**Figure 79 A**) ou des protéines purifiées (**Figure 79 B**) étant, soit du même ordre, soit inférieures aux contrôles négatifs (pET28b ou Blk), le contrôle positif réalisé à l'aide de la protéine *plsC* sauvage étant clairement doublé par rapport à son témoin, nous pouvons en conclure que la protéine CGI-58 de plante n'a pas d'activité LPAAT.

## 6.2. Tests d'activité TG lipase et phospholipase A<sub>2</sub> de la protéine CGI-58, purifiée à partir de la souche SM2-1 :

Nous avons testé l'activité TG lipase des deux protéines d'*Arabidopsis* (*AtCGI*-58 Trc et FL) ainsi que la protéine *MmCGI*-58, purifiées à partir de la souche SM2-1.

Ce test enzymatique a été effectué en utilisant de la trioléine radiomarquée comme substrat, pendant 40 min avec 1 µg de la protéine CGI-58. La TLL (100 ng) a été utilisée comme contrôle positif. L'activité enzymatique a été mesurée en quantifiant à la fin de la réaction l'acide oléique radiomarqué libéré et séparé par CCM (**Figure 80 A**).

On a remarqué clairement que toutes les valeurs de dpm retrouvées dans la fraction acide oléique pour les différentes protéines CGI-58 étaient inférieures à la valeur du Blanc (Blk), effectué dans les mêmes conditions expérimentales mais sans protéine, alors que les dpm dans la fraction acide oléique issue de la réaction catalysée par la TLL (contrôle positif) sont 10 fois plus importants que ceux retrouvés dans le blanc (**Figure 80 A**).



**Figure 80 :** Mesure de l'activité TG lipase (A) et PLA<sub>2</sub> (B) des différentes protéines CGI-58 par comptage des dpm totaux retrouvés dans la fraction acide oléique (A) ou acide palmitique (B) purifiée par CCM. Les différentes barres représentent la moyenne de triplicats  $\pm$  l'écart type de tests enzymatiques effectués pour chaque protéine. Le test a été réalisé en utilisant 1  $\mu$ g de protéine purifiée. Blk, test fait sans enzyme. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  (par rapport au Blk).

De même, pour l'activité PLA<sub>2</sub> de la protéine CGI-58, les mêmes conditions expérimentales du test TG-lipase ont été utilisées, mais dans ce cas, en présence de [<sup>14</sup>C]-DPPC radiomarquée comme substrat, et en utilisant 1 ng de PLA<sub>2</sub> pancréatique de porc comme contrôle positif (**Figure 80 B**). Là encore, on a trouvé que toutes les valeurs de dpm retrouvées dans la fraction acide palmitique pour les différentes protéines CGI-58 étaient inférieures à la valeur du contrôle (Blk) effectué sans protéine, alors que le contrôle positif effectué avec la PLA<sub>2</sub> pancréatique de porc génère des valeurs de dpm 10 fois supérieures à celles trouvées dans le blanc (Blk) (**Figure 80 B**).

Dans cette étude, les deux versions de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* Trc et FL ont été testées pour leur activités enzymatiques pour savoir si l'activité enzymatique rapportée par l'équipe Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.* 2009) était due à la présence de la séquence potentielle d'adressage. Pour les deux versions de la protéine, nous n'avons trouvé ni activité LPAAT ni activité TG lipase ni activité phospholipase (**Figure 79 et Figure 80 A et B**).

De plus, l'équipe Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.* 2009) avait décrit la purification de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* à partir de la souche BL21(DE3) dans des conditions dénaturantes, en utilisant 6 M d'urée, et en faisant la renaturation sur colonne par lavage avec un tampon sans urée, et comme déjà expliqué nous n'avons pas réussi à reproduire leur protocole. De notre côté, pour la purification de la protéine CGI-58, nous avons d'une part, utilisé des conditions non dénaturantes et nous avons purifié la protéine de manière native à partir de deux souches différentes : SM2-1 et BL21(DE3), pour éliminer le problème de contaminant plsC. D'autre part, et ce qui paraît le plus bizarre, ce sont les résultats présentés dans la publication de l'équipe Rajasekharan *et al.* (Ghosh *et al.* 2009), pour les différentes activités lipase et phospholipase par les tests radiomarqués, où cette équipe décrit leur test phospholipase en utilisant 10  $\mu$ g de protéine et 1  $\mu$ Ci de substrat PC (ayant comme activité spécifique de 92,3 Ci/mmol) à une concentration de 100  $\mu$ M dans un volume final de 100  $\mu$ L, cela signifie qu'ils ont utilisé 10 nmol de PC totale, dont 9 pmol qui sont radiomarquées (dilution isotopique d'environ 1000). Après 60 min d'incubation de la protéine, ils trouvaient une activité de 20 pmol d'acide gras formé / mg de protéine (cf. Figure 4 de Ghosh *et al.* 2009), ce qui équivaut à 0,2 pmol d'acide gras pour 10  $\mu$ g de protéine utilisée. Cela veut dire que 1/50000 du substrat a été converti (10 nmol initiale divisé par 0,2 pmol formée). En

conséquence à partir d'une incubation de 1  $\mu$ Ci (2 200000 dpm), 44 dpm devraient être mesurés, qui est une valeur très petite pour être considérée comme une activité enzymatique ou même pour être détectée par rapport à un blanc, et cette valeur-là est obtenue pour une incubation d'une heure.

Pour ces différentes raisons, et en faisant plutôt confiance à nos résultats, réalisés dans des conditions optimisées et en utilisant des contrôles appropriés, on peut dire que la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* ne possède ni une activité LPAAT ni une activité lipase ni une activité phospholipase, de même que démontré par d'autres pour la protéine CGI-58 murine (McMahon *et al.* 2014).

L'histoire, rocambolesque, de l'activité enzymatique potentielle de la protéine CGI-58, à part son rôle comme cofacteur de l'ATGL, ne s'est toutefois pas arrêtée à ce stade. En effet, en 2014, une autre équipe Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2014) a montré une activité LPGAT (lysophosphatidylglycerol acyltransférase) pour la protéine CGI-58 murine. Cette activité ressemble à l'activité LPAAT mais avec la différence de l'accepteur qui est cette fois le lyso-PG. Mais le problème est qu'ils ont également montré une activité LPAAT pour la protéine CGI-58 murine, alors qu'à ce stade, cette activité avait déjà été publiée comme artefactuelle par McMahon *et al.* (McMahon *et al.* 2014), et démontrée également par les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Les deux activités LPGAT et LPAAT décrites dans cette publication ont été mesurées soit sur des extraits bruts de cellules de mammifères exprimant la protéine CGI-58 murine, soit sur la protéine recombinante exprimée et purifiée à partir de cellules d'insectes. Encore une fois, on pouvait (naïvement) soupçonner un artefact dû à un nouveau contaminant, et nous avons voulu donc vérifier une potentielle activité LPGAT de la protéine CGI-58 murine et des deux variants FL et Trc de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis*. Nous avons procédé de la façon suivante :

Dans un premier temps, l'activité LPGAT a été testée *in vitro* en utilisant les protéines purifiées à partir de la souche SM2-1 et/ou BL21(DE3), et en utilisant de même des extraits protéiques bruts issus des transformants.

Dans un second temps, et pour éliminer les effets d'un éventuel contaminant, on a voulu, comme dans le cas de l'activité LPAAT, tester l'activité *in vivo* à l'aide d'un autre système de complémentation qui permettrait le criblage de l'activité LPGAT. Ce criblage est basé sur le même principe que la complémentation de la souche SM2-1. Dans ce nouveau cas, une autre souche d'*E. coli* a été utilisée : la souche MN7 (Nishijima *et al.* 1981), déficiente en enzyme pgsA ou phosphatidylglycerophosphate synthétase A possédant une activité CDP-diacylglycérol : *sn*-glycérol-3-phosphate phosphatidyltransférase (Dryden et Dowhan 1996). Cette souche est sensible à deux antibiotique kanamycine et chloramphénicol, ce qui est adapté à notre système d'expression qui utilise les deux plasmides pYAT7 (résistant au chloramphénicol) et pET28b(+) (résistant à la kanamycine). Cette souche MN7, comme la souche SM2-1, ne pousse pas à 42°C alors qu'elle pousse très bien à 30°C. La souche MN7 a donc été utilisée pour vérifier une éventuelle activité LPGAT *in vivo* pour la protéine CGI-58.

## 7. Tests d'activité LPGAT de la protéine CGI-58 :

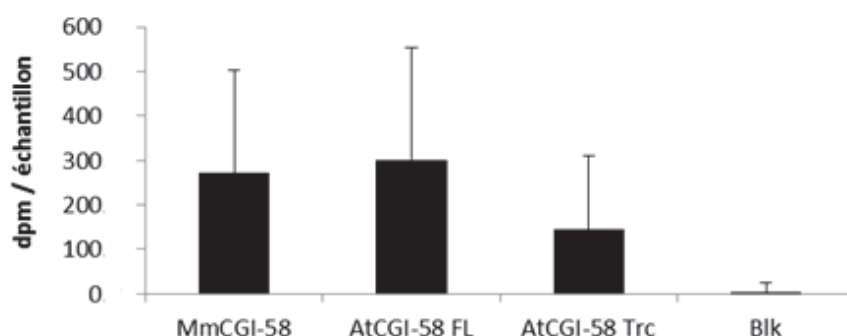
L'activité LPGAT attribuée à la protéine CGI-58 par l'équipe Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2014), consiste à transférer une chaîne acyle d'un acyl-CoA vers un LPG pour produire le PG.

Pour l'activité LPAAT, on pourrait supposer que cela soit dû à un contaminant, vu les résultats de la mutagenèse effectuée par l'équipe Brasaemle *et al.* (McMahon *et al.* 2014) dans la même année sur le motif catalytique HX<sub>4</sub>D, et les résultats *in vivo* et *in vitro* déjà montrés dans ce travail de thèse. Par contre, cela ne pouvait être le cas pour l'activité LPGAT, la synthèse de PG chez *E. coli* n'utilisant pas la voie LPGAT mais la protéine pgsA qui a une activité CDP-diacylglycérol : *sn*-glycérol-3-phosphate phosphatidyltransférase. Pour cela, on a donc testé l'activité LPGAT soit *in vivo* par complémentation de la souche MN7, soit *in vitro* par l'utilisation d'un substrat radiomarké (l'oléoyl-CoA) et de l'accepteur (l'oléoyl-LPG) et voir ainsi s'il y avait formation de PG.

### 7.1. Tests d'activité LPGAT *in vitro* :

La première tentative de mesure de l'activité LPGAT a été effectuée *in vitro* en incubant la protéine purifiée ou l'extrait protéique brut avec le substrat et voir si en point final on détectait la production de PG. Cette technique était la plus rapide et la plus sensible, raison pour laquelle elle a été choisie dans un premier temps.

La protéine CGI-58 murine ou d'*At* FL ou Trc purifiée (1 µg) a été incubée pour 10 min à 32°C en présence d'oléoyl-CoA radiomarké et d'oléoyl-LPG. A la fin de la réaction, le produit attendu de la réaction (PG) a été séparé par CCM et quantifié par comptage des dpm retrouvés dans la zone de migration de ce phospholipide (**Figure 81**).



**Figure 81** : Mesure de l'activité LPGAT *in vitro* des différentes protéines CGI-58 par comptage des dpm totaux de la fraction PG purifiée par CCM. Les différentes barres représentent la moyenne de triplicats ± l'écart type de tests enzymatiques effectués pour chaque protéine. Le test a été réalisé en utilisant 1 µg de protéine purifiée. Blk, test fait sans enzyme.

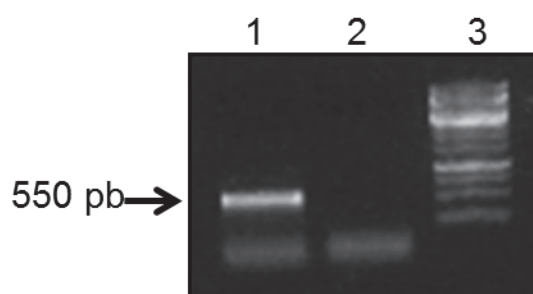
Les résultats sur la protéine purifiée n'ont pas été concluants (**Figure 81**), il y avait une grande différence entre les différents triplicats (écart type très grand), en plus la différence par rapport au blanc (sans protéine) était de l'ordre de 100 ou 300 dpm qui ne sont pas des valeurs indicatives d'une activité LPGAT claire (**Figure 81**).



C'est pour cela qu'on a voulu tester un contrôle positif d'activité LPGAT pour qu'on puisse le comparer à la protéine CGI-58. On avait à notre disposition le gène codant la protéine pgsA.

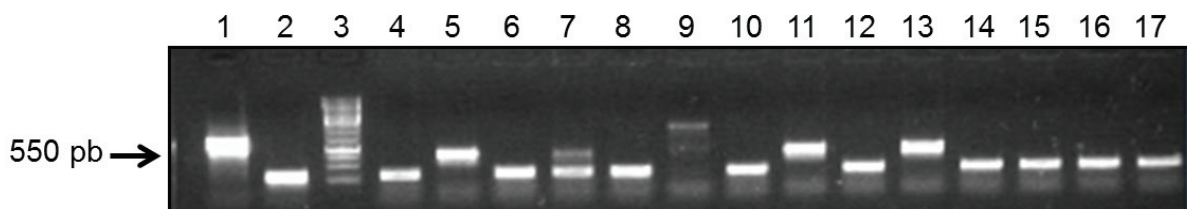
### 7.1.1. Clonage du gène *pgsA* dans le plasmide pET28b(+) :

Le gène *pgsA* issu de la souche sauvage MG1655 a été amplifié par PCR en utilisant les amorces AN233 et AN234 (voir **Tableau S1** Annexe) et en utilisant la Q5 polymérase. Cette PCR a permis d'ajouter les deux sites de clonage *PciI* et *NotI* de part et d'autre de la séquence du gène *pgsA*. La vérification de la PCR a été effectuée par analyse d'électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 82**).



**Figure 82** : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR de l'amplification du gène *pgsA*. **Piste 1** : produit de PCR de l'amplification du gène *pgsA* ; **piste 2** : contrôle négatif de la PCR ; **piste 3** : marqueur de taille moléculaire.

La bande nucléotidique de 550 pb (**Figure 82**) indique la présence du gène *pgsA*. Ensuite le produit de la PCR a été purifié, et la digestion a été effectuée par les deux enzymes de restrictions *PciI* et *NotI* pour le produit de PCR, et *NcoI* et *NotI* pour le plasmide pET28b(+). Le produit de la digestion a été purifié et une ligation a été effectuée par la T4 DNA ligase pour 1 h (les sites de restriction *PciI* et *NcoI* étant compatibles). Le produit de la ligation a été transformé dans la souche Top10 et le criblage des clones positifs a été effectué par PCR en utilisant les deux amorces AN21 et AN28 (voir **Tableau S1** Annexe). Comme indiqué dans la **figure 83**, les clones positifs (pistes 5, 11 et 13) sont identifiés par la présence d'une bande nucléotidique d'environ 550 pb. Un des clones positifs a été mis en culture et le plasmide pET28b-*pgsA* a été amplifié et purifié par midi-préparation d'ADN plasmidique, puis vérifié par séquençage.



**Figure 83** : Criblage par PCR des transformants positifs contenant le plasmide pET28b-*pgsA*. Une bande nucléotidique de 550 pb indique la présence du plasmide recombinant. **Piste 1** : contrôle positif ; **piste 2** : contrôle négatif ; **piste 3** : marqueur de taille ; **pistes 4 à 17** : transformants criblés.

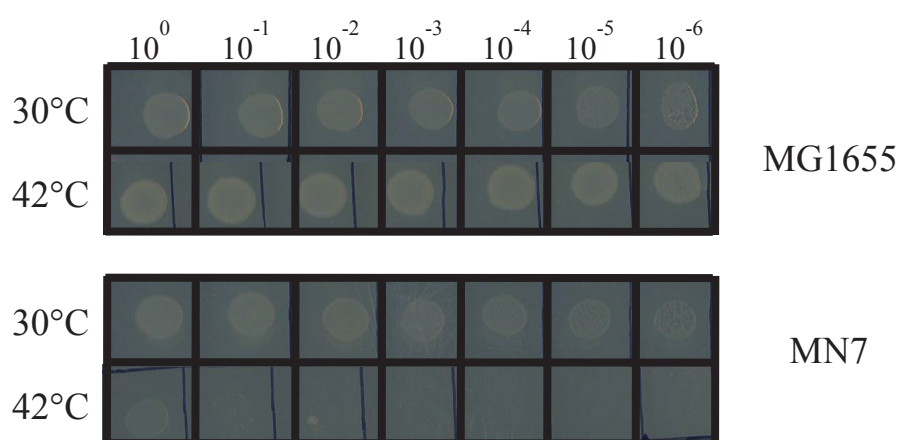
L'étape suivante était de tester cette activité LPGAT *in vivo* à l'aide de la souche MN7 par un test de complémentation à 42°C, et dans ces conditions on pourra utiliser la protéine pgsA comme contrôle positif.

## 7.2. Tests d'activité LPGAT *in vivo* :

Comme dans le cas de l'activité LPAAT, on avait besoin de préparer les outils nécessaires pour la complémentation de la souche MN7 et de vérifier le bon fonctionnement du système avant de l'utiliser pour tester l'effet de l'expression de la protéine CGI-58.

### 7.2.1. Préparation de système de complémentation :

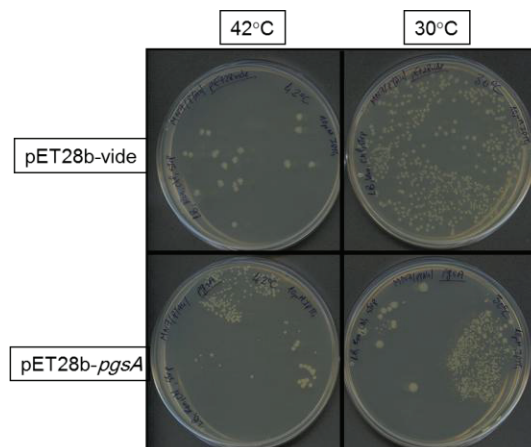
Dans un premier temps, le phénotype de la souche MN7 a été vérifié par croissance de la souche à 30° et 42°C par rapport à une souche sauvage MG1655 (**Figure 84**).



**Figure 84** : Test de croissance à 30° et 42°C sur boîte LB agar de la souche sauvage MG1655 et de la souche MN7 mutée dans le gène *pgsA*. La présence de la tache indique la croissance de la bactérie.

D'après ces résultats, le phénotype de la souche MN7 a été vérifié, l'étape suivante était de voir si l'ajout d'une enzyme de synthèse de PG complémente cette souche et lui permet de pousser à 42°C. Puisque le phénotype de la souche MN7 est dû à la mutation du gène codant la protéine pgsA, on a donc testé si l'apport de la protéine pgsA *wt* (sauvage) dans cette souche permettait la complémentation, ceci servirait de contrôle positif pour la suite des tests. Pour cela le plasmide pET28b-*pgsA* a été utilisé. Cette stratégie de complémentation de la souche MN7 a déjà été présentée dans la littérature (Dryden et Dowhan 1996). La complémentation s'observe en mesurant le nombre de clones obtenus à 42°C par rapport à 30°C.

La souche MN7 a été transformée dans un premier temps par le plasmide pYAT7, puis par le plasmide pET28b-*pgsA* ou par le plasmide vide qui servira de contrôle négatif. La croissance de la souche transformée a été testée par la suite sur boîte LB agar à 30°C et 42°C (**Figure 85**).

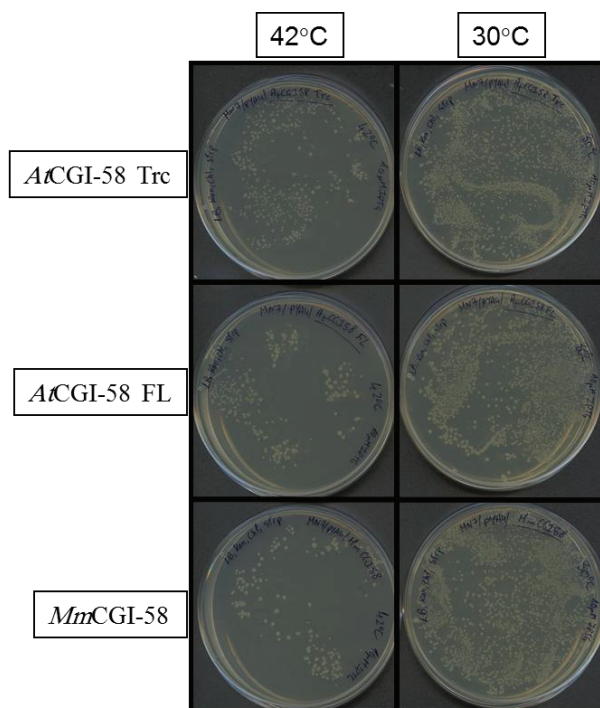


**Figure 85 :** Test de la croissance à 30° et 42°C sur boîte LB agar en présence d'IPTG (10  $\mu$ M) de la souche MN7 transformée par le plasmide pYAT7 ou le plasmide pET28b-*pgsA*. Photo prise après 3 jours de culture.

Le résultat de l'expression de la protéine *pgsA* dans MN7 n'était pas assez clair comme dans le cas de la complémentation de la souche SM2-1 par la protéine *plsC* ; en effet on voit sur la **figure 85** que l'expression de la protéine *pgsA* a perturbé la croissance de la souche même à 30°C ; la souche n'a pas poussé comme le contrôle (vecteur vide) à 30°C. La protéine semble avoir un effet délétère sur la croissance bactérienne, ce qui rend plus difficile à prouver s'il peut y avoir une complémentation à 42°C.

### 7.2.2. Complémentation de la souche MN7 par la protéine CGI-58 :

Malgré ce résultat on a quand même testé la complémentation par la protéine CGI-58 à 42°C (**Figure 86**).



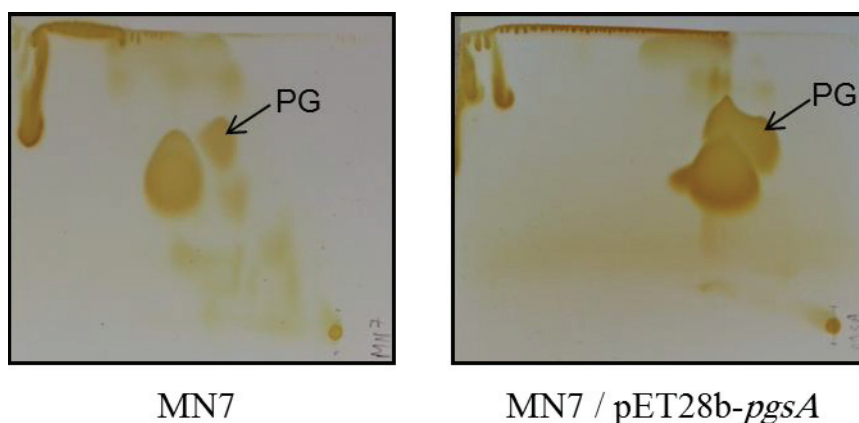
**Figure 86 :** Test de la croissance à 30° et 42°C sur boîte LB agar en présence d'IPTG (10  $\mu$ M) de la souche MN7 transformée par le plasmide pYAT7 et différentes constructions dans le pET28b(+) permettant l'expression de différentes versions de la protéine CGI-58. Photo prise après 3 jours.

Comme craint précédemment, d'après ce résultat, nous ne pouvons pas confirmer l'absence ou la présence d'une activité LPGAT. On voit bien que la souche pousse à 30°C en présence des différentes protéines CGI-58, alors qu'à 42°C on ne voit ni la même croissance qu'observée à 30°C ce qui aurait pu permettre d'affirmer que la souche était complétée, ni la même croissance qu'observée avec le contrôle correspondant au vecteur vide (**Figure 85 pET28b-vide**) ce qui aurait pu permettre d'affirmer que la souche n'était pas complétée.

Au vu des deux résultats, *in vitro* et *in vivo*, qui ne permettaient pas de conclure quant à l'éventualité d'une activité LPGAT, on a donc décidé de voir l'effet éventuel de l'expression de la protéine CGI-58 sur le profil lipidique de la souche MN7 transformée. Puisque la souche MN7 est déficiente en PG, on a alors essayé de voir si l'apport de la protéine CGI-58 permettait d'augmenter le taux de PG dans les cellules.

### 7.2.3. Vérification de l'activité LPGAT *in vivo* par extraction et analyse des lipides :

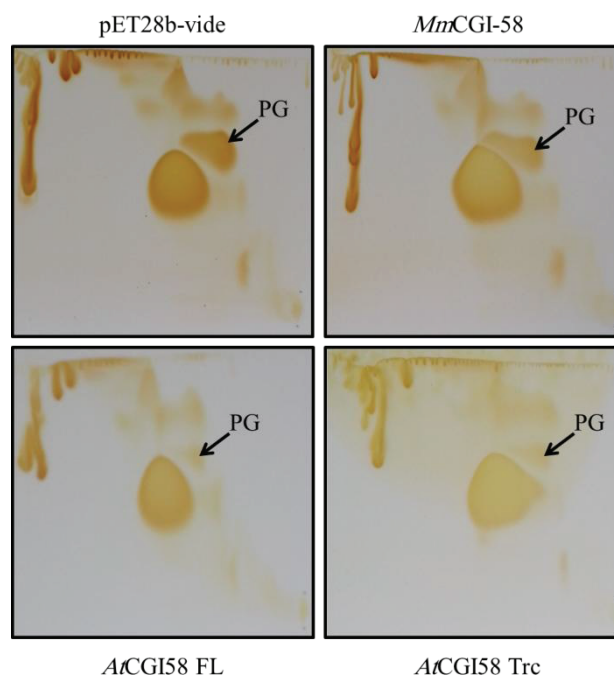
Tout d'abord, on a testé l'effet de l'expression de la protéine pgsA sur le profil lipidique de la souche MN7 par rapport à la souche sauvage MG1655. Les lipides totaux ont été donc extraits à partir des cultures induites puis séparés par CCM bidimensionnelle (**Figure 87**).



**Figure 87** : Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques de la souche MN7 exprimant la protéine pgsA.

On peut voir donc que l'apport de la protéine pgsA augmente la teneur en PG cellulaire (**Figure 87**, à droite), et donc cette technique a été utilisée pour tester l'effet de l'expression des protéines CGI-58.

Les lipides des cultures de la souche MN7 exprimant les différentes protéines CGI-58 (murine et d'*At* FL ou Trc) ont été alors analysés par CCM bidimensionnelle (**Figure 88**), pour vérifier si on voyait une accumulation ou une restauration de la teneur en PG, et donc une activité LPGAT.



**Figure 88 :** Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques de la souche MN7 exprimant la protéine CGI-58.

Les résultats de cette expérience furent assez étonnants :

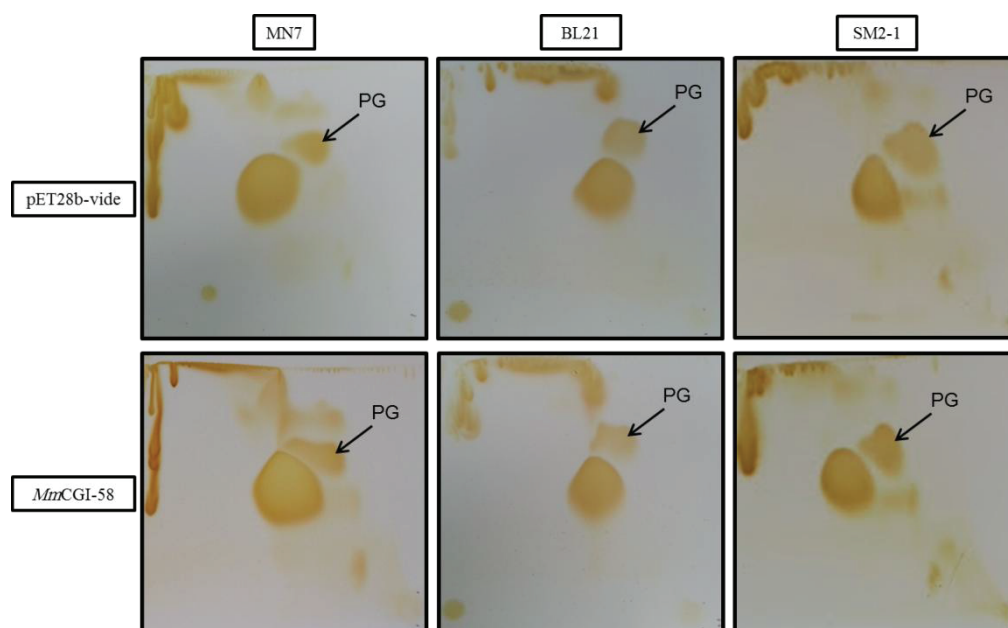
- Pour la protéine *MmCGI-58*, on voit une légère différence au niveau de la quantité de PG par rapport au contrôle négatif (**Figure 88**, panneau de haut), ce qui peut indiquer la présence d'une activité LPGAT pour la protéine CGI-58 murine.
- Cependant, dans le cas de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* (Trc ou FL) l'intensité de la tache de PG semble être inférieure à celle du contrôle négatif (**Figure 88**, panneau du bas). Ce résultat indique une potentielle activité PG hydrolase en lieu et place de l'activité LPGAT (ou PG synthétase) pour la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis*, ce qui est assez probable vu que la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* possède la triade catalytique Ser-Asp/Glu-His comme celle trouvée chez les lipases, à la différence de la protéine *MmCGI-58* où la sérine catalytique potentielle est remplacée par une asparagine.

On a donc testé par la suite, par la même technique, si on retrouvait des résultats identiques dans les différentes souches d'*E. coli* testées (BL21, SM2-1 et MN7), ceci pour confirmer ces deux activités différentes, et pour tester ensuite les différents mutants effectués sur les acides aminés potentiellement catalytiques et voir si ça affectait les quantités de PG, ce qui confirmerait l'activité enzymatique de la protéine CGI-58.

#### 7.2.4. Vérification de l'activité LPGAT de la protéine *MmCGI-58* :

En premier temps, et pour vérifier si la protéine *MmCGI-58* possédait véritablement une activité LPGAT, les niveaux de PG ont été mesurés dans différentes souches exprimant la protéine *MmCGI-58* sauvage par rapport au contrôle négatif (vecteur vide). On a donc analysé

l'extrait lipidique par CCM bidimensionnelle dans les souches suivantes : MN7, BL21(DE3) et SM2-1 (**Figure 89**).

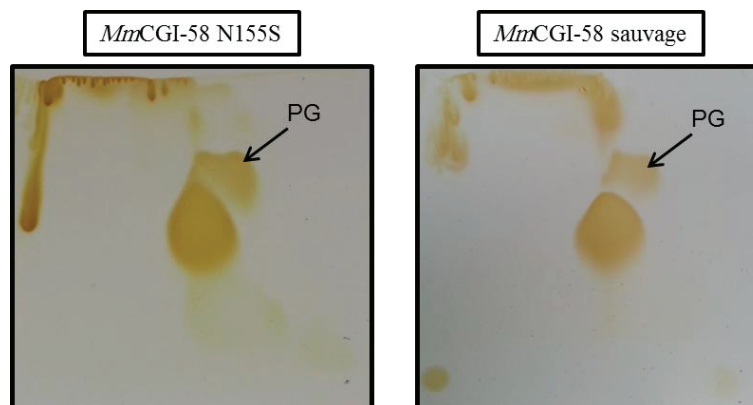


**Figure 89** : Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques des différentes souches d'*E. coli* exprimant la protéine *MmCGI-58*.

Le résultat de cette analyse nous a permis de confirmer, dans ces conditions, l'absence d'activité LPGAT de la protéine *MmCGI-58* ; la densité des taches de PG observée lors de l'expression de la protéine *MmCGI-58* dans les différentes souches testées est visuellement identique à celle observée dans le contrôle négatif (**Figure 89**).

Le mutant N155S de la protéine *MmCGI-58* dont lequel l'asparagine a été remplacé par la sérine, dans la triade catalytique potentielle de la protéine, a aussi été testé, pour savoir si en remettant la sérine on pourrait avoir la même diminution du taux de PG constatée pour la protéine *AtCGI-58*. D'après l'analyse par CCM bidimensionnelle de l'extrait lipidique de la souche BL21 exprimant la protéine *MmCGI-58* N155S (**Figure 90**), il semble que la remise de la sérine n'avait pas d'effet sur la protéine, on remarque les mêmes niveaux de PG dans la protéine sauvage et la protéine mutée. Cette expérience, qu'il fallait toutefois tenter, donne un résultat prévisible. La mutation N155S est retrouvée dès la divergence des Vertébrés vers les Amphibiens au Dévonien, il y a 400 millions d'années. L'évolution, depuis, de la protéine CGI-58 a dû entraîner d'autres mutations dans ses structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires, qui ont dû faire de la protéine CGI-58 actuelle une toute autre protéine que celle ancestrale ayant subi cette mutation N155S.





**Figure 90 :** Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques de la souche BL21 d'*E. coli* exprimant la protéine *MmCGI-58* sauvage ou mutée (N155S).

Il semble finalement que la protéine *MmCGI-58* n'ait ni activité LPAAT ni activité LPGAT ni activité PG hydrolase, à la différence de son homologue chez les plantes où on a observé une modification du niveau de PG, et qui donc pourrait avoir une activité PG hydrolase ou être impliquée dans le mécanisme de l'hydrolyse du PG. Pour vérifier ces hypothèses, on a testé *in vivo* l'effet de l'expression de la protéine *AtCGI-58* sauvage ou mutée sur le profil lipidique dans différentes souches d'*E. coli* : BL21, SM2-1 et MN7 ainsi que l'activité PG hydrolase *in vitro* sur un substrat PG radiomarqué et synthétisé par une réaction de transphosphatidylolation catalysée par une PLD (cf. Matériel et Méthodes, partie 9).

## 8. Activité PG hydrolase de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* :

L'activité PG hydrolase potentielle de la protéine CGI-58 d'*Arabidopsis* a été vérifiée *in vitro* en utilisant cette fois-ci du PG radiomarqué, et *in vivo* soit par CCM des extraits lipidiques des différentes souches exprimant la protéine, soit par spectrométrie de masse en quantifiant le PG dans les mêmes extraits lipidiques.

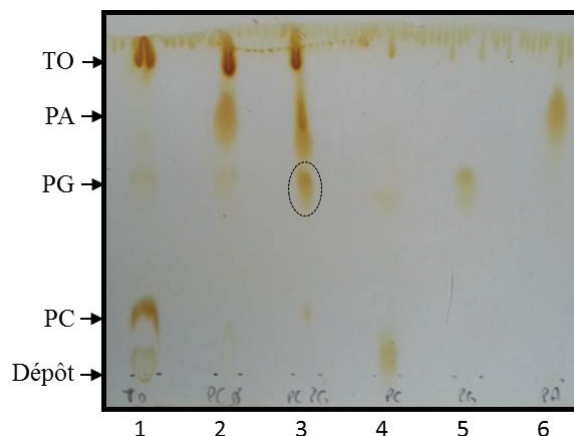
### 8.1. Tests d'activité PG hydrolase de la protéine *AtCGI-58* *in vitro* :

Le substrat PG utilisé dans ce test enzymatique a été synthétisé en premier temps à partir d'une PC radiomarquée ( $[^{14}\text{C}]$ -DPPC) par une réaction de transphosphatidylolation catalysée par la PLD en utilisant le glycérol comme accepteur du groupement phosphatidyle.

#### 8.1.1. Synthèse de PG radiomarqué :

La synthèse du PG radiomarqué a été faite par une réaction de transphosphatidylolation en utilisant l'enzyme PLD, et la  $[^{14}\text{C}]$ -DPPC comme substrat en présence de glycérol. La PLD, en plus de son activité hydrolytique des phospholipides, est capable d'utiliser, à la place de la molécule d'eau, un alcool primaire comme accepteur du résidu phosphatidyle. En ajoutant dans le milieu réactionnel du glycérol, la PLD est capable de permettre la synthèse de PG. Le PG radiomarqué a été ensuite séparé par CCM et purifié.

La réaction a d'abord été réalisée sur des substrats non radioactifs, puis vérifiée par CCM (**Figure 91**), où on voit bien la formation du PG.

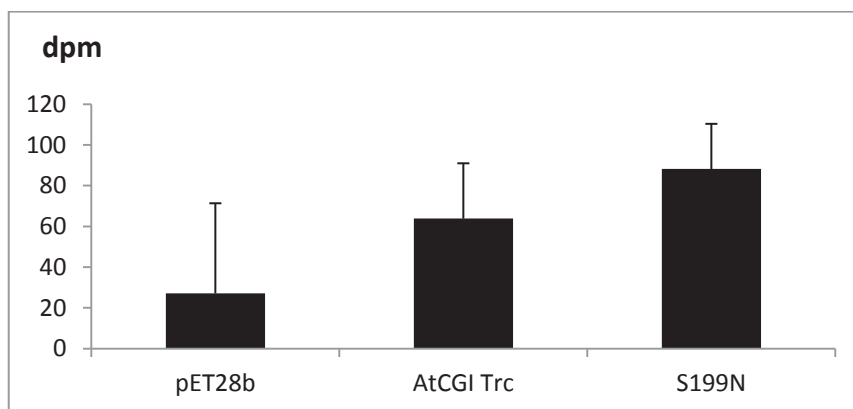


**Figure 91 :** Analyse par CCM de la réaction de transphosphatidyltransfer catalysée par la PLD.

**Piste 1 :** contrôle de migration de la PC et de la trioléine (TO) ; **piste 2 :** réaction effectuée sans glycérol (réaction d'hydrolyse) ; **piste 3 :** réaction de transphosphatidyltransfer en présence de glycérol ; **piste 4 :** contrôle de migration de la PC ; **piste 5 :** contrôle de migration du PG ; **piste 6 :** contrôle de migration du PA. La tache correspondante à la formation du PG est entourée en pointillé.

### 8.1.2. Mesure de l'activité PG hydrolase :

L'activité PG hydrolase de la protéine CGI-58 est effectuée en incubant à 30°C pendant 30 min l'extrait brut protéique d'*E. coli* exprimant la protéine AtCGI-58 *wt* (sauvage) ou le mutant S199N d'AtCGI-58 ou le pET28b-vide avec la DPPC radiomarquée. Après séparation du milieu de lipolyse par CCM, les acides gras (acide palmitique) ont été quantifiés par comptage des dpm (**Figure 92**). Les résultats montrent qu'il n'y avait pas de différences significatives dans les valeurs de dpm entre le mutant (AtCGI-58 S199N) et le sauvage (AtCGI-58 Trc). L'activité PG hydrolase potentielle de la protéine AtCGI-58 n'était donc pas évidente par ce test *in vitro*.



**Figure 92 :** Mesure de l'activité PG hydrolase de la protéine AtCGI-58 par comptage des dpm totaux retrouvés dans la fraction acide palmitique purifiée par CCM.

Les différentes barres représentent la moyenne des triplicats  $\pm$  l'écart type de tests enzymatiques pour chaque protéine. Le test a été effectué en utilisant 10  $\mu$ g d'extrait protéique.

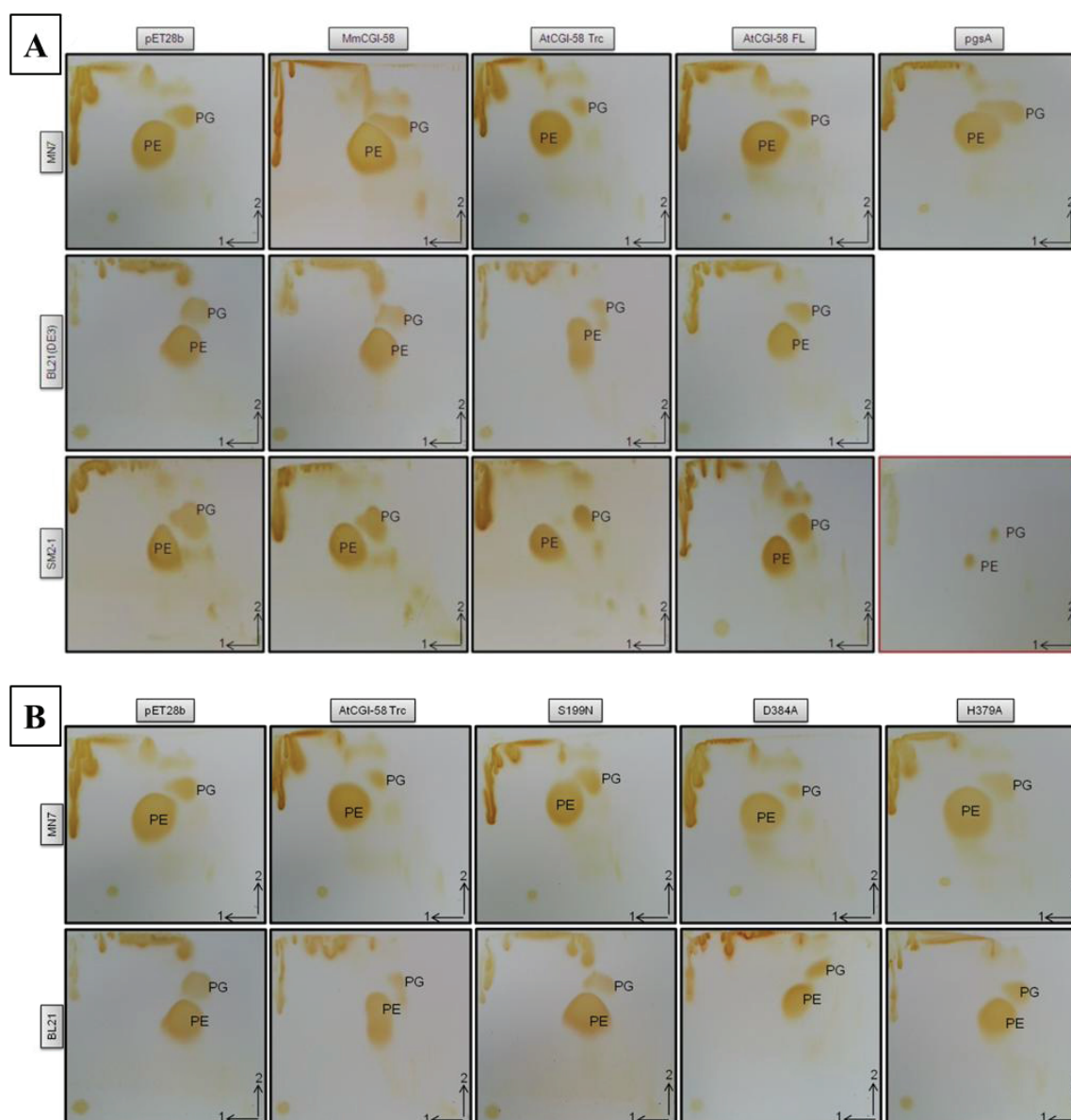
L'absence d'activité PG hydrolase dans ces tests *in vitro* peut être due aux conditions utilisées qui pourraient ne pas être optimisées pour détecter une activité potentielle de la protéine CGI-58 ; pour cela des tests *in vivo* ont été entamés.

## 8.2. Tests d'activité PG hydrolase de la protéine CGI-58 *in vivo* :

Ces tests ont été effectués en deux étapes : en premier temps on a essayé de voir qualitativement par CCM une différence des taux de PG dans différentes souches d'*E. coli* exprimant la protéine *AtCGI-58*. Dans un second temps, on a vérifié quantitativement la formation de PG par spectrométrie de masse.

### 8.2.1. Détection de l'activité PG hydrolase de la protéine CGI-58 par CCM :

L'extrait lipidique des différentes souches (BL21, SM2-1 et MN7) exprimant soit les protéines sauvages *AtCGI-58* Trc ou FL soit les mutants S199N, D384A et H379A ont été analysés par CCM (**Figure 93**).



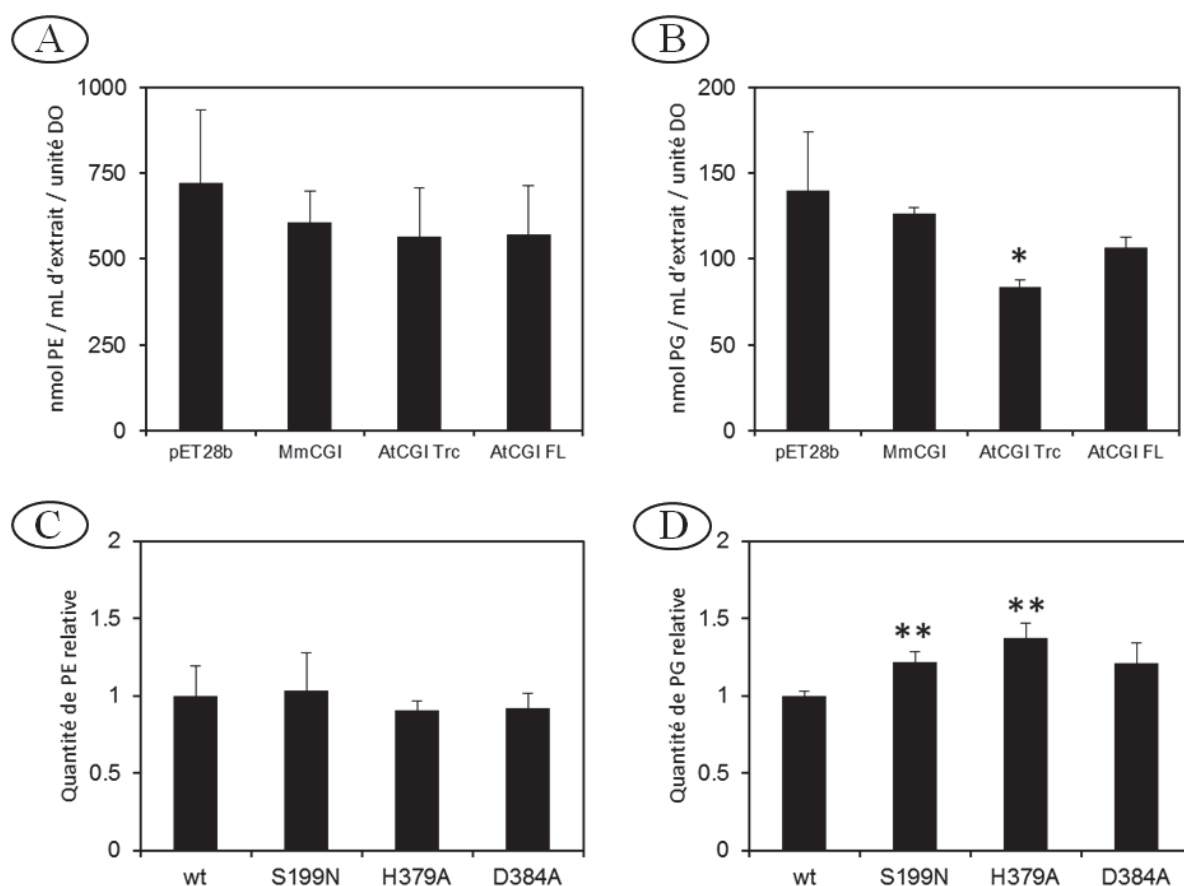
**Figure 93** : Analyse par CCM bidimensionnelle des extraits lipidiques des différentes souches d'*E. coli* exprimant la protéine CGI-58 sauvage (A) ou les mutants catalytiques potentiels de la protéine *AtCGI-58* (B). Le chromatogramme encadré en rouge représente le contrôle de migration de PE et PG. Les flèches indiquent le sens de migration.

Par analyse des différents chromatogrammes de la **figure 93 A**, on remarque que l'expression de la protéine *AtCGI-58* dans les différentes souches d'*E. coli* fait diminuer le taux de PG dans les cellules par rapport au contrôle négatif représenté par l'extrait lipidique issu de la même souche exprimant le vecteur vide pET28b(+). De plus, la diminution des taux de PG est plus marquée pour la version Trc que pour la version FL de la protéine *AtCGI-58* (**Figure 93 A**), cela pourrait renforcer l'hypothèse que cette séquence peptidique, N-terminale, variable et non conservée chez les plantes, est peut-être nécessaire pour l'adressage de la protéine, et pourrait être clivée pour rendre la protéine fonctionnelle. L'analyse des résultats des mutants des sites catalytiques potentiels (**Figure 93 B**) confirme de plus, que la diminution des taux de PG était due à la sérine de la triade catalytique ; en mutant la Sérine 199, on retrouve les mêmes niveaux de PG qu'observés dans le contrôle négatif. En plus, ces résultats ont permis de confirmer l'importance de l'Histidine 379 au niveau de la triade catalytique. En effet, la mutation H379A avait le même effet de diminution des niveaux de PG que celle de la S199N, tandis que la mutation de l'acide aspartique de la triade catalytique potentielle (D384A) n'avait aucun effet sur les niveaux de PG par rapport à l'expression de la protéine sauvage (**Figure 93 B**).

Ce résultat qualitatif de la diminution du taux de la PG montre une implication potentielle de la protéine *AtCGI-58* dans le métabolisme des PG. Pour valider cette hypothèse et avoir des données quantitatives, les niveaux de PG et de PE ont été mesurés dans l'extrait lipidique issu de la souche SM2-1 exprimant les différentes protéines CGI-58 en utilisant la spectrométrie de masse, cette souche présentant visuellement les effets les plus dramatiques.

#### **8.2.2. Mesure quantitative de l'activité PG hydrolase par spectrométrie de masse :**

Les extraits lipidiques de la souche SM2-1 exprimant soit la protéine sauvage *MmCGI-58* ou *AtCGI-58* Trc ou FL soit les mutants S199N, D384A et H379A de la protéine *AtCGI-58* Trc ont été analysés par LC/MS/MS. Les quantités de PG et de PE dans chaque échantillon ont été calculées en utilisant des standards de PG et de PE (cf. Matériel et Méthodes). Les moyennes de triplicats de chaque préparation sont présentées dans la **Figure 94**.



**Figure 94** : Mesure par spectrométrie de masse de la quantité de PG et de PE dans les extraits lipidiques de la souche SM2-1 exprimant les différentes versions de la protéine CGI-58. Les différentes barres représentent la moyenne des triplicats  $\pm$  l'écart type de trois clones indépendants. Pour les protéines sauvages *MmCGI*-58 et *AtCGI*-58 Trc et FL, les quantités de PG et de PE sont exprimées en nmol / mL de culture et normalisées par la DO à 600 nm de la culture cellulaire, \* $P < 0,05$  (par rapport au pET28b) (A et B). Pour les protéines mutées S199N, H379A et D384A, les quantités relatives de PG et de PE normalisées par rapport à la quantité dans le sauvage *AtCGI*-58 Trc (wt) ont été représentées, \*\* $P < 0,01$  (par rapport au wt) (C et D).

Ces résultats quantitatifs ont permis de confirmer l'implication de la protéine *AtCGI*-58 dans le métabolisme des PG. Aucune différence significative des quantités de PE n'a été observée (**Figure 94, A**), alors qu'une réduction de 40 % de taux de PG a été calculée dans les clones exprimant la protéine *AtCGI*-58 Trc par rapport au contrôle négatif (pET28b-vide) (**Figure 94, B**) confirmant ainsi les résultats obtenus par analyse CCM (voir **Figure 93**). Par contre, pour la version FL de la protéine *AtCGI*-58, cette variation du taux de PG n'était pas significative, ce qui suggère que le clivage de la séquence peptidique d'adressage pourrait être nécessaire pour rendre la protéine fonctionnelle. Cependant, une augmentation de 22 et 38 % de taux de PG par rapport à la protéine sauvage a été calculée lorsque les protéines mutés S199N et H379A sont exprimées, respectivement (**Figure 94, D**), ce qui confirme l'implication des deux résidus de la triade catalytique, la Ser199 et l'His379, dans la diminution de PG. Par ailleurs, le taux de PG n'est statistiquement pas différent entre l'extrait lipidique issu de l'expression de la protéine *AtCGI*-58 sauvage et celui du mutant D384A (**Figure 94, D**), ce qui renforce l'hypothèse que le résidu D384 n'appartient pas à la triade catalytique potentielle de la protéine, comme cela était prédit. En fait, le résidu D384 n'est pas

conservé chez toutes les plantes exprimant la protéine CGI-58 (voir **Figure S1** Annexe), et ce résidu est remplacé parfois par un Glu, comme chez *Theobroma cacao* et *Solanum lycopersicum*. Il est donc possible qu'un autre résidu comme D302 ou D351, qui sont conservés chez toutes les plantes, constituent le troisième résidu de la triade catalytique. Le résidu D351 a été déjà identifié par modélisation comme le résidu catalytique potentiel de la triade catalytique comme pour la protéine CGI-58 murine (Oberer *et al.* 2011), de plus l'homologue du résidu D384 de la protéine murine se trouve plutôt à la surface extérieure de la protéine, plus loin de la triade catalytique (McMahon *et al.*, 2014).

La diminution des taux de PG peut être dû soit à la régulation du métabolisme du PG par la protéine CGI-58, soit à l'hydrolyse directe du PG, ou de l'un de ces précurseurs comme le CDP-diacylglycérol-glycérol-3-phosphate (Lu *et al.* 2011) par l'activité hydrolase de la triade catalytique de la protéine AtCGI-58. Pour tester l'hypothèse que le PG soit un substrat de la protéine CGI-58 de plante, un PG radiomarké a été incubé avec de la protéine CGI-58, mais aucune hydrolyse n'a été détectée (cf. 8.1). Ceci suggère que soit le PG n'est pas vraiment un substrat de la protéine, soit le test dans ces conditions ne contient pas un accepteur pour la réaction.

L'implication de la protéine CGI-58 dans le métabolisme du PG a déjà été observée pour la protéine CGI-58 de mammifère (Brown *et al.* 2010), les auteurs ont observé une augmentation d'un facteur 10 de la quantité du PG dans le foie, augmentation due à l'inhibition de l'expression de la protéine CGI-58 murine. Un tel effet a aussi été observé lors de l'analyse du profil lipidique chez les plantes mutées sur le gène *cgi-58* (James *et al.* 2010), où le taux de PG et non de PC, de PE, de PI ou de PS, a été augmenté par rapport au génotype sauvage.

Vu que dans la protéine CGI-58 murine, le résidu Ser catalytique potentiel est remplacé par un Asp, on pourrait supposer que l'effet de la protéine CGI-58 sur les taux de PG est probablement dû, chez les mammifères, à une fonction régulatrice de la protéine plutôt qu'à une fonction d'hydrolyse. Mais les résultats obtenus dans ce travail de thèse, pour les mutants Ser199 et His379 de la protéine CGI-58 de plante, renforcent l'hypothèse, au moins pour la protéine de plante, que la diminution de PG est due à une hydrolyse directe du PG ou de ses précurseurs ou dérivés par la protéine CGI-58 *via* la triade catalytique. Il est toujours possible que la protéine CGI-58 de mammifère ne soit pas fonctionnelle dans un système procaryotique comme *E. coli*, ce qui peut expliquer l'absence de l'activité de la protéine dans ce système, en comparaison avec les activités rapportées dans la littérature dans des systèmes d'expressions eucaryotiques. On peut encore supposer vu le remplacement de la Ser par un Asp dans la protéine CGI-58 de mammifère que les deux protéines CGI-58 de plante et de mammifère possèdent deux rôles différents. Il est clair que ces deux protéines participent à la régulation du métabolisme lipidique, mais leur activité enzymatique reste toujours ambiguë. Nous avons montré dans ce travail de thèse que la protéine CGI-58 ne possède ni activité LPAAT ou LPGAT, ni activité lipase ou phospholipase. Par contre, on a pu montrer, dans les conditions testées, que la protéine CGI-58 de plante et non de mammifère est impliquée par sa triade catalytique dans le métabolisme du PG.



## II. Adipocyte triglycéride lipase ou ATGL

### Clonage, expression et purification

La découverte de l'ATGL, première enzyme de la cascade lipolytique, en 2004 (voir partie Bibliographie), a changé les perspectives de recherche biomédicale vers la caractérisation de cette nouvelle enzyme. En fait, plusieurs études sont actuellement focalisées sur l'implication de l'ATGL et de son cofacteur, la protéine CGI-58, dans des pathologies liées au métabolisme des lipides. Mais, on ignore à ce jour les caractéristiques biochimiques exactes de ces deux protéines ainsi que le mécanisme d'activation précis de l'ATGL par la protéine CGI-58.

L'ATGL et la protéine CGI-58 sont toutes les deux impliquées dans la régulation du métabolisme des TG, donc comprendre leur mécanisme d'action est crucial pour le contrôle de la mobilisation des lipides, et par suite pour contrôler les mécanismes et maladies associés au métabolisme des lipides comme la NLS, l'obésité et le diabète de type 2, ce qui ouvrirait de nouvelles perspectives vers des cibles thérapeutiques potentielles.

Ce projet de recherche avait pour but d'approfondir nos connaissances sur la libération des acides gras du tissu adipeux, d'étudier les caractéristiques biochimiques ainsi que les relations structure-fonction de l'ATGL et de la protéine CGI-58. Plusieurs étapes ont été requises, dont la première est celle de l'expression et la purification de l'ATGL et de la protéine CGI-58. En effet plusieurs travaux ont été entamés sur la production à grande échelle de l'ATGL mais aucune réussite n'avait encore été publiée.

Dans ce but, nous disposons de l'ADNc de l'ATGL murine et de son homologue chez les plantes. Nous envisageons de cloner, puis produire ces protéines en grande quantité en utilisant les différents systèmes d'expression *E. coli* et la levure *Pichia pastoris*, systèmes utilisés au laboratoire pour l'expression de lipases digestives et de la HSL. Cette étape est suivie de la mise au point de méthodes de purification efficaces pour chaque protéine, pour à la fin, tester leurs activités enzymatiques en utilisant les substrats appropriés.

Plusieurs constructions ont été donc effectuées en utilisant les gènes disponibles codant l'ATGL végétale et murine, et deux vecteurs d'expression, pGAPZαA chez *Pichia pastoris* et pET28b(+) chez *E. coli*. Le but était d'avoir une protéine pure et active quel que soit le système utilisé.

#### 1. Tentative d'expression dans *P. pastoris* de l'ATGL murine ou *MmATGL* :

La première construction qui a été entreprise est celle du clonage du gène codant *MmATGL* dans le pGAPZαA, le choix de cette combinaison pour débiter reposait sur deux critères :

##### 1.1. Choix du vecteur pGAPZαA :

Le vecteur pGAPZαA (cf. Matériel et Méthodes) a été choisi en premier pour trois raisons :

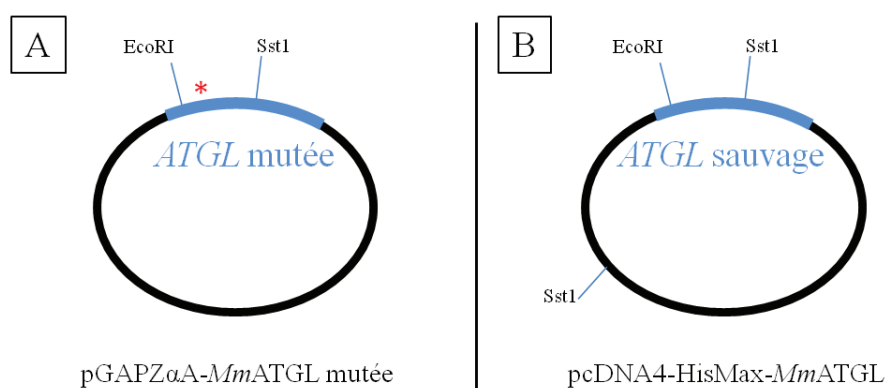
- La présence du peptide signal du facteur  $\alpha$  de *S. cerevisiae* qui permet la fusion de ce peptide à une protéine d'intérêt et donc la sécrétion des protéines recombinantes vers le milieu extracellulaire, ce qui permet d'obtenir des protéines solubles plus faciles à purifier. De plus, le plasmide permet de rajouter, en C-terminal de la protéine, une étiquette poly-histidines qui sera utilisé pour la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité.
- Le promoteur constitutif pGAP qui fonctionne chez *P. pastoris*, n'implique pas l'utilisation du méthanol pour induire l'expression, et permet une forte expression constitutive des protéines recombinantes.
- L'expression se fait dans un organisme eucaryote, il y a donc une préservation des modifications post-traductionnelles (glycosylation, ponts disulfures, etc.) nécessaires pour le fonctionnement des enzymes.

## 1.2. Gène murin :

Le gène murin codant l'ATGL a le plus d'homologie de séquence avec le gène humain (86 %), on a donc plus d'intérêt à étudier la protéine murine que la protéine des plantes en premier lieu. De plus, la protéine murine avait été démontrée comme catalytiquement active (Zimmermann *et al.*, 2004 ; Villena *et al.*, 2004 ; Jenkins *et al.*, 2004).

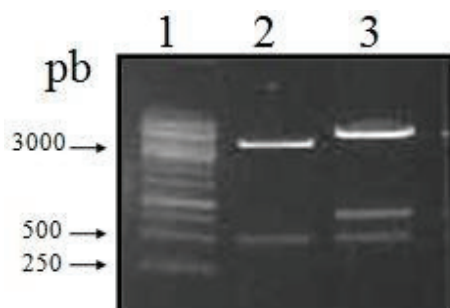
## 1.3. Préparation du vecteur et insert :

A mon arrivé au laboratoire, un plasmide pGAPZ $\alpha$ A contenant l'ADNc codant l'ATGL était déjà prêt. Mais le problème de cette construction est que l'ADNc inséré contenait une mutation, et elle n'exprimait donc pas la protéine ATGL sauvage. Il y avait aussi, dans le laboratoire, une autre construction contenant l'ADNc codant l'ATGL sauvage mais inséré dans le plasmide pcDNA4-HisMax, provenant de l'équipe du Prof. R. Zechner (Graz, Autriche). Pour avoir donc la construction désirée, pGAPZ $\alpha$ A-*Mm*ATGL sauvage, nous avons décidé de remplacer la partie mutée de l'ADNc de la construction faite dans le pGAPZ $\alpha$ A par la partie sauvage issue de la construction pcDNA4-HisMax-*Mm*ATGL. Par chance, cette mutation était localisée entre deux sites de restriction, *EcoRI* et *SstI* (**Figure 95**).



**Figure 95 :** Représentation schématique des deux plasmides pGAPZ $\alpha$ A-*Mm*ATGL mutée (A) et pcDNA4-HisMax-*Mm*ATGL sauvage (B) avec la position des sites de restriction *EcoRI* et *SstI*. La partie bleue représente l'ADNc codant l'ATGL ; \* : position de la mutation.

Pour libérer la partie de l'ADNc codant l'ATGL sauvage de la construction pcDNA4-HisMax-*MmATGL* (**Figure 95 B**), le plasmide a été digéré par les enzymes *EcoRI* et *SstI*. En même temps, et pour enlever la partie mutée, la construction pGAPZαA-*MmATGL* a été digérée par les mêmes enzymes (**Figure 95 A**). La digestion a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 96**).



**Figure 96 :** Vérification par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) de la digestion par *EcoRI* et *SstI* du vecteur pGAPZαA-*MmATGL* mutée (**piste 2**) et du vecteur pcDNA4-HisMax-*MmATGL* sauvage (**piste 3**) ; **Piste 1** : marqueur de taille. La bande de plus grand taille de la piste 2 correspond au vecteur pGAPZαA sans la partie mutée de l'ADNc codant l'ATGL, et la petite bande de la piste 3 correspond à la partie sauvage de l'ATGL.

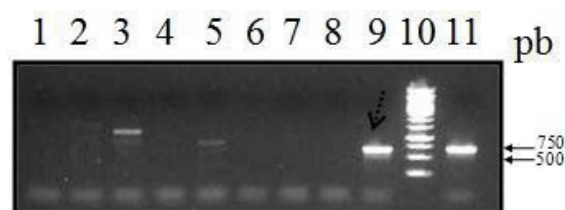
Le vecteur pGAPZαA-*MmATGL* contient un seul site *EcoRI* et un seul site *SstI*, et la digestion par les deux enzymes libère donc deux fragments (**Figure 96, piste 2**) dont celui de 3,1 kb qui correspond au vecteur et celui de 500 pb qui correspond à la partie mutée de l'ADNc codant l'ATGL. Pour la construction pcDNA4-HisMax-*MmATGL*, il y a deux sites *SstI* et un site *EcoRI* (**Figure 95 B**), et la digestion libère donc trois fragments (**Figure 96, piste 3**) dont le plus petit (500 pb) correspond au même fragment de l'ATGL, que celui libéré lors de la digestion du plasmide pGAPZαA-*MmATGL*, mais cette fois ci non muté. Les produits de la digestion ont été séparés par électrophorèse, et les bandes correspondant au vecteur et à l'insert ont été purifiées. Le vecteur et l'insert ont été quantifiés par spectrophotométrie : 46,3 ng/μL et 42,1 ng/μL respectivement.

Le vecteur et l'insert ont été liés en présence de la T4 ADN ligase. Les plasmides recombinants sont ensuite introduits dans les cellules Top10 par électrolocation (voir partie Matériel et Méthodes).

#### 1.4. Criblage et purification du plasmide recombinant :

La vérification de la transformation et de la ligation a été effectuée par PCR en utilisant les amorces AN059 (*MmATGL* sens) et AN060 (*MmATGL* anti-sens) (**Figure 97**), une bande de 650 pb indique la présence de l'insert *MmATGL* dans le vecteur pGAPZαA.

Parmi les 9 clones testés, il y en avait un seul où l'on peut voir une bande de 650 pb (**Figure 97, piste 9**). Ce clone a été mis en culture et l'ADN plasmidique a été purifié et quantifié ; une concentration de 332,3 ng/μL a été obtenue.

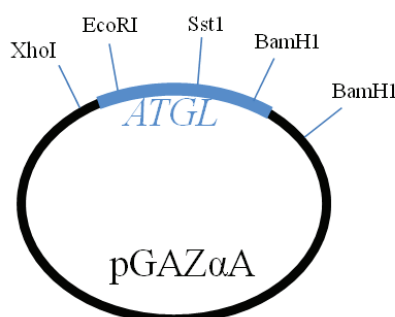


**Figure 97 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR obtenu sur les transformants (dans la souche Top10) contenant potentiellement la construction pGAPZ $\alpha$ A-*Mm*ATGL, en utilisant les amorces AN059 et AN060. La bande dans la piste 9 indique (flèche) la présence du plasmide pGAPZ $\alpha$ A-*Mm*ATGL dans le clone. **Piste 1 à 9 :** transformants 1 à 9 analysés ; **piste 10 :** marqueur de taille ; **piste 11 :** contrôle positif, pGAPZ $\alpha$ A-*Mm*ATGL muté.

### 1.5. Vérification de la séquence du plasmide recombinant :

Les plasmides pcDNA4-HisMax et pGAPZ $\alpha$ A conférant tous les deux la résistance à la Zéocine, il était indispensable de vérifier, par restriction, qu'il n'y avait pas de contamination croisée du vecteur au cours des étapes de purification de l'insert et de la réaction de ligation. Tout en étant très proches, ces deux plasmides ont des profils de restriction différents. Le plasmide obtenu (cf. 1.4) a été donc d'abord vérifié par coupure enzymatique en comparant le profil attendu en théorie (**Figure 98 B**), avec le profil de digestion par différentes enzymes de restriction (**Figure 98 C**).

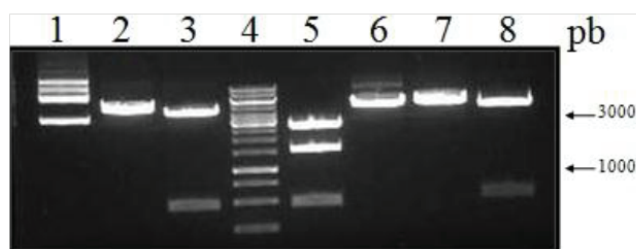
A



B

Enzyme (nombre de sites de restriction dans le plasmide)	Piste 1 sans enzyme	Piste 2	Piste 3	Piste 4	Piste 5	Piste 6	Piste 7
XhoI (1)		X		X			
BamHI (2)			X	X			
SstI (1)					X		X
EcoRI (1)						X	X
Profil attendu	Plusieurs bandes	Une seule bande	Deux bandes	Trois bandes	Une seule bande	Une seule bande	Deux bandes

C



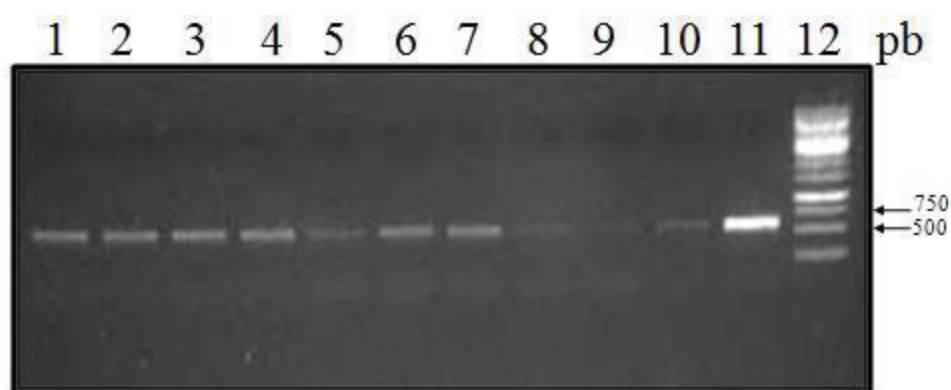
**Figure 98** : Vérification par coupure enzymatique du clonage du plasmide pGAPZαA-*MmATGL*. **(A)** Site de coupure des différentes enzymes de restrictions dans le plasmide pGAPZαA-*MmATGL*. L'ADNc de l'*ATGL* est présenté en bleu. **(B)** : Profil attendu après digestion de la construction pGAPZαA-*MmATGL* par différentes enzymes de restriction. La piste 1 (sans enzyme) permet d'avoir le profil du vecteur natif, alors que la piste 2 permet d'obtenir celle du vecteur linéarisé. **(C)** : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) des produits de la digestion du plasmide pGAPZαA-*MmATGL* par différentes enzymes de restriction. **Piste 1** : sans enzyme ; **piste 2** : XhoI ; **piste 3** : BamHI ; **piste 4** : marqueur de taille ; **piste 5** : XhoI et BamHI ; **piste 6** : SstI ; **piste 7** : EcoRI ; **piste 8** : SstI et EcoRI.

Le profil de restriction obtenu (**Figure 98 C**) correspond au profil théorique (**Figure 98 B**), le plasmide a été donc vérifié par séquençage pour contrôler qu'il n'y avait pas de mutation dans le gène. Ces résultats ont confirmé que la construction était correcte, notamment qu'il s'agissait bien de la séquence du vecteur pGAPZαA, et que la séquence codant l'*ATGL* ne comportait aucune mutation.

### 1.6. Transformation de *P. pastoris* et criblage :

La levure (*P. pastoris*) est un microorganisme particulièrement intéressant pour l'expression hétérologue puisqu'elle permet des manipulations génétiques aisées, telles que l'intégration ciblée du gène et l'expression de manière intra ou extracellulaire des protéines recombinantes. *P. pastoris* est également capable de réaliser des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, la formation de ponts disulfures et le clivage protéolytique.

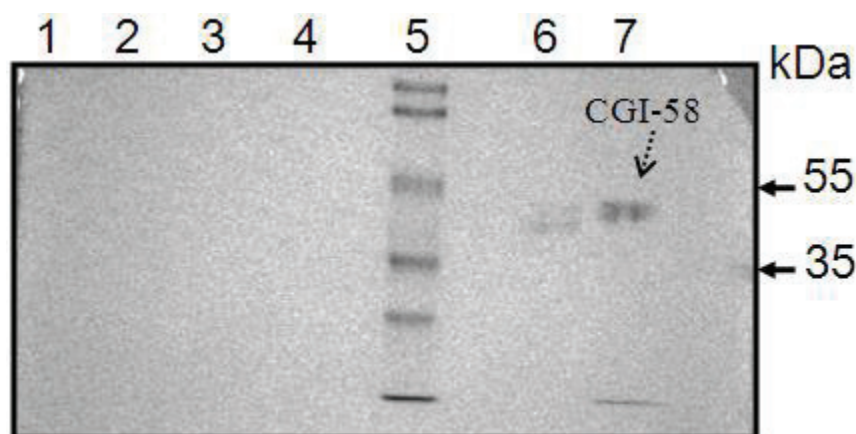
Pour ces raisons, la souche X33 de cette levure a été choisie pour l'expression. Le plasmide pGAPZαA-*MmATGL* a donc été transformé en utilisant le protocole de transformation par le chlorure de lithium (voir Matériel et Méthodes). Les clones obtenus ont été testés par PCR avec la Taq polymérase (**Figure 99**), en utilisant les amorces AN029 (situé sur le promoteur pGAP, sens) et AN047 (*MmATGL*, anti-sens). Une bande nucléotidique de 660 pb indique une transformation positive. Parmi les clones testés, 7 étaient positifs (**Figure 99**, pistes 1 à 7).



**Figure 99** : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de PCR sur les transformants de la souche X33 contenant la construction pGAPZαA-*MmATGL*, en utilisant les amorces AN029 et AN047. Les puits où une bande entre 500 et 750 est retrouvée indique que les clones sont positifs. **Piste 1 à 10** : transformants 1 à 10 analysés ; **piste 11** : contrôle positif (plasmide pGAPZαA-*MmATGL*) ; **piste 12** : marqueur de taille.

### 1.7. Expression de l'ATGL recombinante :

Pour tester l'expression de l'ATGL recombinante, un des clones positifs (clone 1, piste 1, **Figure 99**) a été mis en culture pendant trois jours à 30°C sous agitation. L'analyse des échantillons provenant du surnageant et du cytosol cellulaire par immunoempreinte (**Figure 100**), en utilisant un anticorps anti poly-histidines, vu que le plasmide pGAPZαA permet l'ajout d'une étiquette 6xHis en C-terminal de la protéine, n'a révélé aucune protéine aux alentours de 55 kDa, qui est la masse théorique attendue de l'ATGL.



**Figure 100 :** Analyse par immunoempreinte de l'expression de l'ATGL dans *P. pastoris* dans différentes fractions de cultures. **Piste 1 :** surnageant de culture (clone transformé par le pGAPZαA-MmATGL) ; **piste 2 :** surnageant de culture (clone transformé par le pGAPZαA-vide) ; **piste 3 :** extrait protéique total de cellule entière (clone transformé par le pGAPZαA-MmATGL) ; **piste 4 :** extrait protéique total de cellule entière (clone transformé par le pGAPZαA-vide) ; **piste 5 :** marqueur de masse moléculaire ; **piste 6 et 7 :** contrôle positif, protéine MmCGI-58 6xHis N-terminal.

Plusieurs essais d'expression de l'ATGL murine dans ce système ont été entamés, mais sans aucune réussite. Ce système d'expression de l'ATGL a été utilisé pour la première fois, les travaux précédents publiés dans la littérature ont été faits avec des cellules humaines et présentent déjà un très faible taux d'expression. De plus, l'ATGL, une protéine qui agit à l'interface lipidique et donc largement hydrophobe, reste donc probablement intrinsèquement difficile à exprimer. D'autre part, l'ADNc utilisé est d'origine murine, l'expression de protéines recombinantes de mammifères, particulièrement celle-ci riche en GC à près de 60 %, est plus difficile dans ces organismes. Dans ce système d'expression on a utilisé un promoteur constitutif, les résultats négatifs de l'expression de l'ATGL murine, pourraient être dûs à la contre-sélection due à la surexpression de la protéine qui peut être toxique pour la souche.

En parallèle du clonage de l'ATGL murine dans le pGAPZαA, d'autres constructions de l'ATGL ont été réalisées. Une de ces constructions a été faite dans le même plasmide pGAPZαA mais en utilisant l'homologue de l'ATGL chez les plantes *A. thaliana* (*At*) nommé SDP1 (Eastmond, 2006) (voir partie Bibliographie). Le but était toujours d'obtenir une protéine recombinante et active, quel que soit le système utilisé.



## 2. Tentative d'expression dans *P. pastoris* de l'homologue de l'ATGL chez *A. thaliana* :

Dans cette construction, le vecteur pGAPZaA qui permet l'expression dans *P. pastoris* a été conservé, vu son importance, tant de la présence du peptide signal que de l'utilisation d'un système d'expression eucaryotique. Le gène murin a été remplacé par son homologue chez les plantes *A. thaliana*. Une des problèmes chez les plantes c'est qu'on ne connaît pas encore très bien les systèmes d'adressage, et qu'il n'existe pas de véritables séquences consensus des peptides d'adressage. Les alignements de séquences de la SDP1 avec l'ATGL de mammifères (Homme, souris, rat) (**Figure 101**) montrent que la SDP1 contient, peut-être, un tel peptide d'adressage potentiellement clivé. Pour cette raison deux constructions de l'*AtATGL* ont été réalisées.

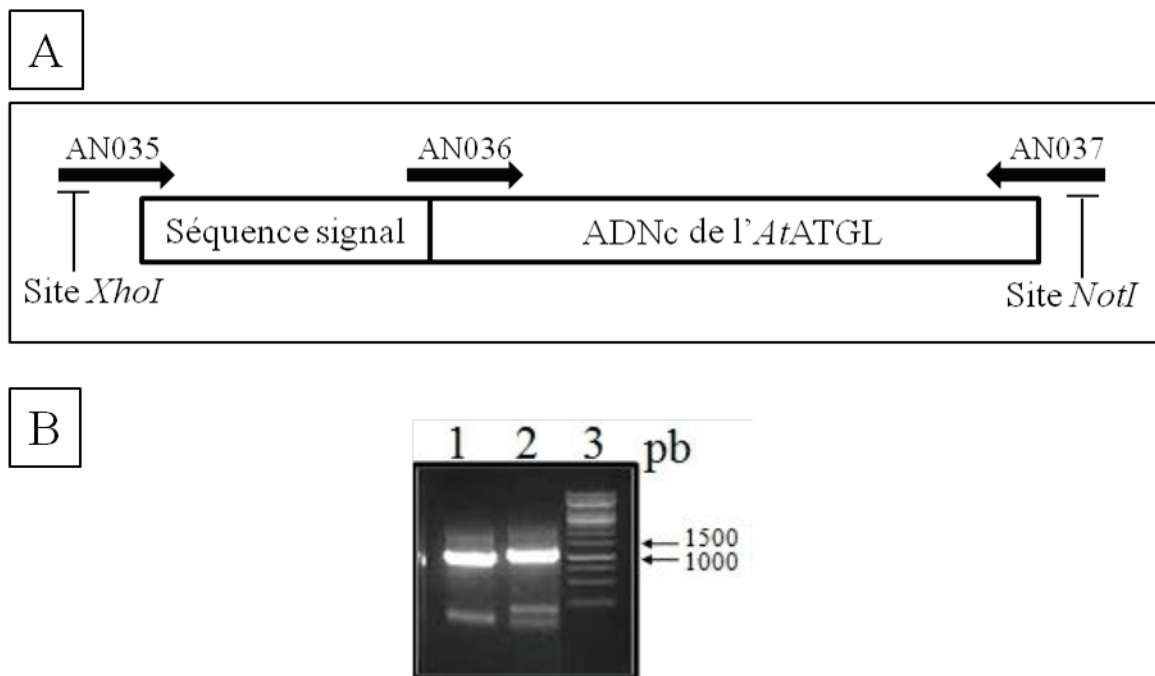
SDP1/1-825	1	MDISNEASVDPFSGIPSSIMGRITAFRVLFCSRMSQLRRDLFRLLHWFRLFKLTVPFVSWFHRPNPQGI LAVVTIIAFVL	82
ATGL_HOMME/1-504	1	.....	.....
ATGL_SOURIS/1-486	1	.....	.....
ATGL_RAT/1-478	1	.....	.....
SDP1/1-825	83	KRYTNVKIKAE MAYRRKFWRNMMRTALTYEEWAHAAKMLEKETPKMNESDLYDEELVKNKLQELRHRREQGSLRDI MFCMRA	164
ATGL_HOMME/1-504	83	.....	.....
ATGL_SOURIS/1-486	83	.....	.....
ATGL_RAT/1-478	83	.....	.....
SDP1/1-825	165	DLVRNLGNMNCSELHKGR LQVPRHIKEYIDEVSTQLRMVCNSDSEELSLEEKLSFMHETRHAFGR TALLLSGASLGAFHV	246
ATGL_HOMME/1-504	165	.....MF PREK.....TWNISFAGCGFLGVYV	24
ATGL_SOURIS/1-486	165	.....MF PRET.....KWNISFAGCGFLGVYH	24
ATGL_RAT/1-478	165	.....MF PRET.....KWNISFAGCGFLGVYH	24
SDP1/1-825	247	VVRTLV EHKLLPRI.....IAGSSVGSIIICAVVAS-RSWPELQ-SFFENS-LHSLQFFDQLGGVFSIVKRVMTQGA LHDIRQL	321
ATGL_HOMME/1-504	247	.....	95
ATGL_SOURIS/1-486	247	.....	95
ATGL_RAT/1-478	247	.....	95
SDP1/1-825	322	QQLMRLNLT SNLTQFEAYDMTGRI LGITVCSPRKH EPPRCLNYLTSPHVVIWSAVTASCAFPGLFEAQLMAKDRSGEIVPYH	403
ATGL_HOMME/1-504	322	.....SHEHASGR LGISLTRVSDGEN.....VIISH.....FNSKDEL IQANVCSTFIPVY	151
ATGL_SOURIS/1-486	322	.....CHERANGRLGISLTRVSDGEN.....VIISH.....FNSKDEL IQANVCSTFIPVY	151
ATGL_RAT/1-478	322	.....CHTRASGR LGISLTRVSDGEN.....VIISH.....FNSKDEL IQANVCSTFIPVY	151
SDP1/1-825	404	PPFNLDPEVGTKSSSGRRWRDGSLEVDLPMMQLKELFNVNHFIVSQAN.....PHIAPL.....LRKDLVRAYGGRF	471
ATGL_HOMME/1-504	404	.....CGLIPPSLQGVRYVDGGISDNLP LYE LKNTITVSPFSGESD ICPQDSSTNIHEL RVNTNTSIQFNLRNLRLSKALF	227
ATGL_SOURIS/1-486	404	.....CGLIPPTLQGVRYVDGGISDNLP LYE LKNTITVSPFSGESD ICPQDSSTNIHEL RVNTNTSIQFNLRNLRLSKALF	227
ATGL_RAT/1-478	404	.....CGLIPPTLQGVRYVDGGISDNLP LYE LKNTITVSPFSGESD ICPQDSSTNIHEL RVNTNTSIQFNLRNLRLSKALF	227
SDP1/1-825	472	AAKLAHLVEMEVKHRQNVLELG FPLGGLAKLFADEWEGDVTVMFPATLAQYSKIIQNPTHVELQKAA.....NQGRRTCTW	547
ATGL_HOMME/1-504	472	.....EPLVLRMCKQGYRDGLRFLRRNGLLNQF.....NPLLALPPARPHGPEDK.....DQAVESA.....QAEDYSQLPGEDHIL	297
ATGL_SOURIS/1-486	472	.....EPMVLRMCKQGYRDGLRFLRRNGLLNQF.....NPLLALPPVVPQEEADE.....EAAVVEERAGEEDQLQPYRKDRIL	299
ATGL_RAT/1-478	472	.....EPMVLRMCKQGYRDGLRFLRRNGLLNQF.....NPLLALPPVVPQEEADE.....EAAVTEERTGGE.....DRIL	291
SDP1/1-825	548	EKLSA IKSNCGL ELAL..DDSVAILNHMRRLKKS AERAATATSSSHHGLASTTRFNASRRIPSNNVLAR.....ENSTGSL	621
ATGL_HOMME/1-504	548	.....EHLPARLNEALLEACVEPTDLLTTL SNMLPVRLATAMMPVY.....TLPLES.....ALSFTIRLLEWLPDVPEDIRWMKEQTGSI	373
ATGL_SOURIS/1-486	548	.....EHLPARLNEALLEACVEPKDLMTT LSNMLPVRLATAMMPVY.....TLPLES.....AVSFTIRLLEWLPDVPEDIRWMKEQTGSI	375
ATGL_RAT/1-478	548	.....EHLPARLNEALLEACVEPKDLMTT LSNMLPVRLATAMMPVY.....TLPLES.....AVSFTIRLLEWLPDVPEDIRWMKEQTGSI	367
SDP1/1-825	622	DDLVTDNNLHASSGRNLS DSE.....TESVESSWTRTGGLMRTASANKFIDFVQSLDID.....I	678
ATGL_HOMME/1-504	622	.....CQYLVMR- AKRKLGRHLPSRLPEQVELRRVQSLPSVPLSCAAYREALPGWMRNNSLGDA..LAKWEECQRQLLLGLFCTNV	452
ATGL_SOURIS/1-486	622	.....CQYLVMR- AKRKLGDHLP SRLSEQVELRRVQSLPSVPLSCATYSEALPNWVRNNSLGDA..LAKWEECQRQLLLGLFCTNV	454
ATGL_RAT/1-478	622	.....CQYLVMR- AKRKLGDHLP SRLSEQVELRRVQSLPSVPLSCATYSEALPNWVRNNSLGDA..LAKWEECQRQLLLGLFCTNV	446
SDP1/1-825	679	A.....LV RGF.....SSSPNSF AVPPGGS....FTPSPRSIAAHS DIESNSNSNNLG TSTSSITVTEGDL LQPERTSNG	744
ATGL_HOMME/1-504	679	.....AFPPEALRM RAPADPAPAPADPASPQHQLAGPAPLLSTPAPEAR.....PVIGALGL.....	504
ATGL_SOURIS/1-486	679	.....AFP PDALRM RAPASPTAA..DPATPDQDPPLPPC.....	486
ATGL_RAT/1-478	679	.....AFP PDALRM RAPASPTAT..DPATPDQDPPLPPC.....	478
SDP1/1-825	745	FVLNVVKREN LGMP SIGNQNTLPESVQLD IPEKEMDCSSVSEHEEDNDN EEEHNGSSLVTVSSEDSGLQEPVSGSVIDA	825
ATGL_HOMME/1-504	745	.....	.....
ATGL_SOURIS/1-486	745	.....	.....
ATGL_RAT/1-478	745	.....	.....

**Figure 101** : Alignement de séquences peptidiques de la SDP1 et de l'ATGL de mammifères (Homme, souris, rat).

## 2.1. Préparation du plasmide :

L'ADNc (gène *At1g33270*) a été amplifié par PCR pour obtenir deux constructions, avec une étiquette 6xHis en C-terminal, et les deux sites de clonage *XhoI* et *NotI*, mais avec la différence, de la présence ou non, de la séquence signal d'adressage (on ne connaît pas notamment si cette séquence est nécessaire pour l'activité enzymatique). La construction a été appelé « Tronquée ou Trc » sans la séquence d'adressage et « *Full length* ou FL » avec la séquence d'adressage. La PCR a été faite avec la KOD polymérase, en utilisant les amorces suivantes : AN036 / AN037 pour l'ATGL Trc et AN035 / AN037 pour l'ATGL FL (**Figure 102 A**).

La vérification de l'amplification par PCR (**Figure 102 B**) a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose. Dans la piste 1 (**Figure 102 B**), une bande de 1000 pb et dans la piste 2 (**Figure 102 B**) une bande de 1100 pb sont identifiées, correspondant respectivement à l'ADNc amplifié codant l'*AtATGL* Trc et FL.



**Figure 102** : Amplification du gène codant l'*AtATGL* par PCR. **(A)** : Position des amorces AN035, 036 et 037 utilisées pour avoir les deux versions, *full-length* et tronquée de l'*AtATGL*, avec l'addition des sites *XhoI*, *NotI*, et de l'étiquette 6xHis en position C-terminale. **(B)** : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de la PCR sur l'ADNc de l'*AtATGL*. La bande entre 1000 et 1500 pb indique la présence de l'ADNc codant l'*AtATGL*. **Piste 1** : version tronquée ; **piste 2** : version *full-length* ; **piste 3** : marqueur de taille.

Les produits de la PCR ont été purifiés et ensuite digérés par les deux enzymes de restriction *XhoI* et *NotI*. Après purification et quantification, la ligation des inserts avec le vecteur pGAPZαA digéré par les mêmes enzymes a été effectuée. La transformation des cellules Top10 n'a donné aucun transformant positif. Le travail de clonage a été arrêté à ce stade. Par ailleurs, l'expression dans le système procaryotique en utilisant le plasmide pET28b(+), de la protéine CGI-58 (voir partie Résultats et Discussion de la protéine CGI-58) ou de l'ATGL (qui est détaillé dans la partie suivante), a été plus encourageante à ce stade du

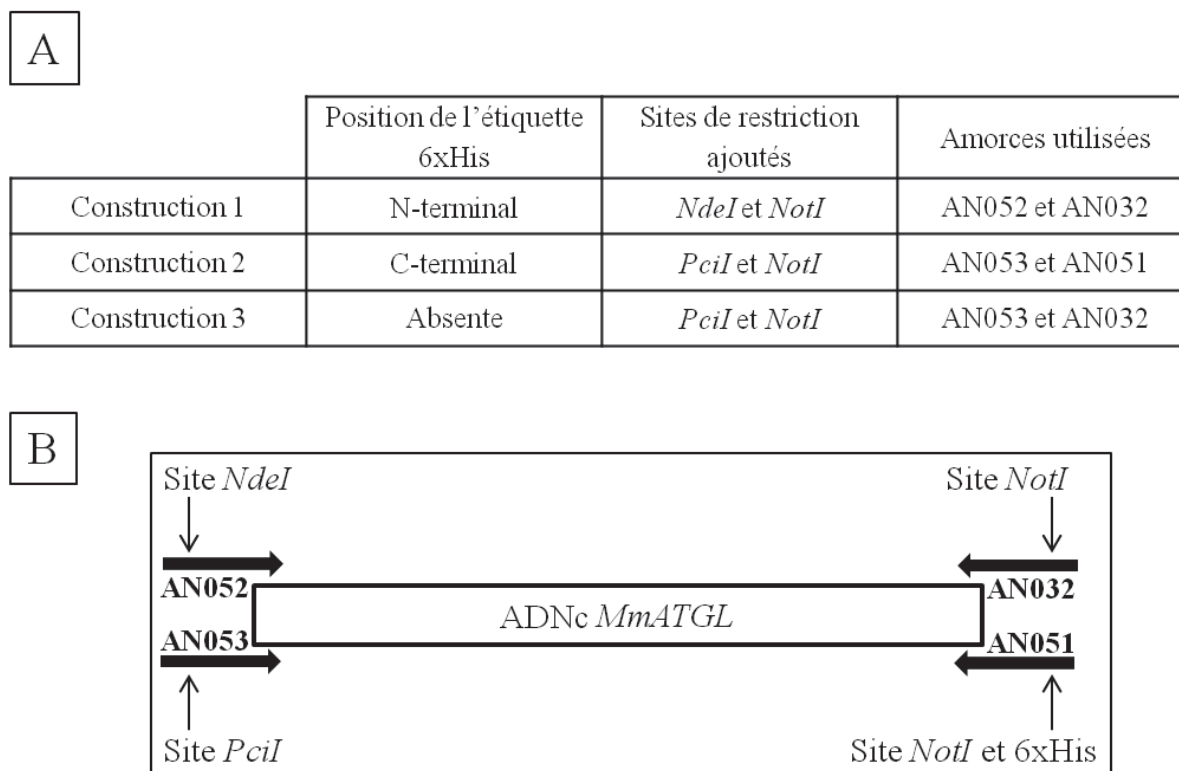
travail. Nous avons donc décidé d'investir dans les constructions effectuées dans le plasmide pET28b(+).

### 3. Tentative d'expression dans *E. coli* de *MmATGL* :

Puisque pour la protéine CGI-58, l'expression dans *E. coli* a bien fonctionné, on a donc voulu tester l'expression de l'ATGL dans ce système. Pour cette construction, le même gène murin codant l'ATGL a été utilisé, mais cloné dans le vecteur pET28b(+), ce système qui permet l'expression dans les bactéries est certes moins intéressante que le système levure au niveau des modifications post-traductionnelle, mais il reste plus rapide et plus simple.

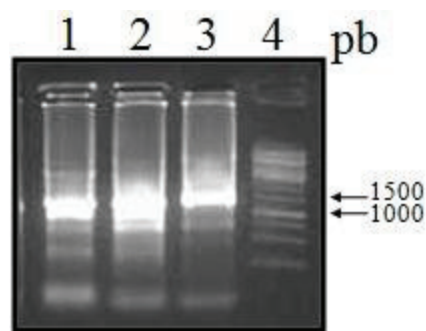
#### 3.1. Préparation des plasmides :

Le fragment d'ADN codant *MmATGL* a été amplifié et modifié par PCR avec la KOD polymérase. Différentes constructions ont été réalisées pour obtenir une protéine ATGL fusionnée avec soit une étiquette 6xHis en N-terminal ou en C-terminal, soit sans étiquette. Pour cela, différentes amorces ont été utilisées (**Figure 103**) :



**Figure 103 :** (A) : Les trois constructions de *MmATGL* avec la position de l'étiquette et les sites de restriction ajoutés. (B) : Position des amorces AN032, 051, 052 et 053 utilisées pour obtenir les trois constructions *MmATGL*.

La PCR a été vérifiée sur gel d'agarose (**Figure 104**), et les fragments ont été purifiés. On peut voir dans les pistes 1, 2 et 3 la bande de 1100 pb caractéristique du fragment de l'ADNc codant l'ATGL.



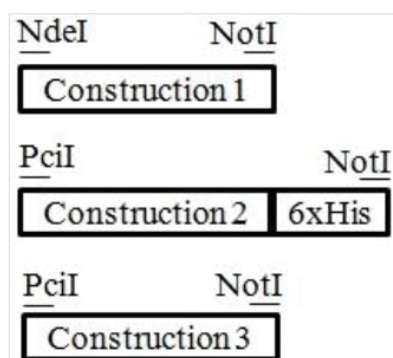
**Figure 104 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de la PCR réalisée sur l'ADNc de *MmATGL*. Une bande entre 1000 et 1500 indique l'amplification du fragment. **Piste 1 :** construction 1 ; **piste 2 :** construction 2 ; **piste 3 :** construction 3 ; **piste 4 :** marqueur de taille.

Par la suite les fragments de PCR et le vecteur pET28b(+) ont été digérés par les enzymes convenables pour faire la ligation comme indiqué dans la **figure 105 :**

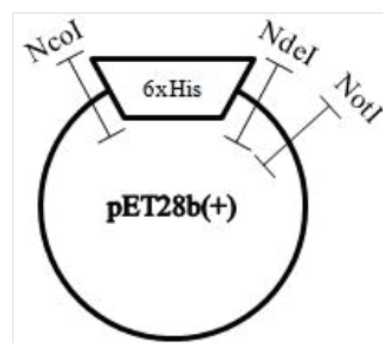
A

	Fragment de PCR (insert) coupé par :	pET28b(+) (vecteur) coupé par :
ATGL étiquetée en N-terminal (construction 1)	NdeI et NotI	NdeI et NotI
ATGL étiquetée en C-terminal (construction 2)	PciI et NotI	NcoI et NotI
ATGL sans étiquette (construction 3)	PciI et NotI	NcoI et NotI

B



Insert



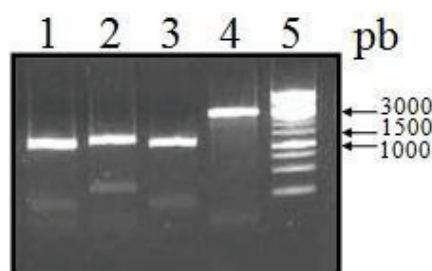
Vecteur

**Figure 105 :** (A) : Enzymes de restriction utilisées pour la coupure de l'insert *MmATGL* et du vecteur pET28b(+). (B) : Position des sites de restriction utilisés pour la coupure du vecteur pET28b(+) et des trois constructions *MmATGL*.

Pour les constructions 2 et 3, l'insert a été coupé par les enzymes PciI et NotI, alors que le vecteur a été coupé avec NcoI et NotI. La raison de l'utilisation de deux enzymes différentes est que l'insert contient déjà un site NcoI au milieu du fragment, et donc on ne

peut pas utiliser cette enzyme pour le digérer, raison pour laquelle une autre enzyme, PciI, a été utilisée. Cette dernière, coupe la séquence (A-CATGT) et libère le même bord cohésif que la coupure obtenue par NcoI qui coupe, elle, la séquence (C-CATGG).

La digestion a été vérifiée sur gel d'agarose (**Figure 106**) et le produit de la digestion a été purifié et quantifié. Ensuite, la ligation a été réalisée par la T4 DNA ligase dans un rapport vecteur : insert (1 : 3).



**Figure 106** : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) de la digestion de l'insert *MmATGL* (bande entre 1000 et 1500 pb) et du vecteur pET28b(+) (bande au niveau de 3000 pb). **Piste 1** : construction 1 ; **piste 2** : construction 2 ; **piste 3** : construction 3 ; **piste 4** : vecteur ; **piste 5** : marqueur de taille.

Les cellules Top10 ont été transformées par le produit de ligation et étalées sur boîte de Petri contenant du LB et de la Kanamycine. Pour différencier les clones positifs comportant le vecteur contenant le gène, des clones avec le vecteur reliqué sur lui-même, un criblage des transformants a été effectué. Pour le criblage les amorces AN021 (pET28b(+)) T7 promoteur sens) et AN062 (*MmATGL* anti-sens) ont été utilisées et une bande nucléotidique d'environ 450 pb indiquant la présence de la construction désirée a été obtenue (résultats non présentés).

Un clone positif de chaque construction a été mis en culture à 37°C pendant la nuit, suivi par une midi-préparation (cf. Matériel et Méthodes). L'ADN plasmidique purifié a été quantifié par spectrophotométrie, et les trois clones ont été séquencés pour vérifier l'authenticité de la séquence.

### 3.2. Expression et purification de la protéine *MmATGL* dans *E. coli* :

#### 3.2.1. *MmATGL* étiquetée 6xHis en N-terminal :

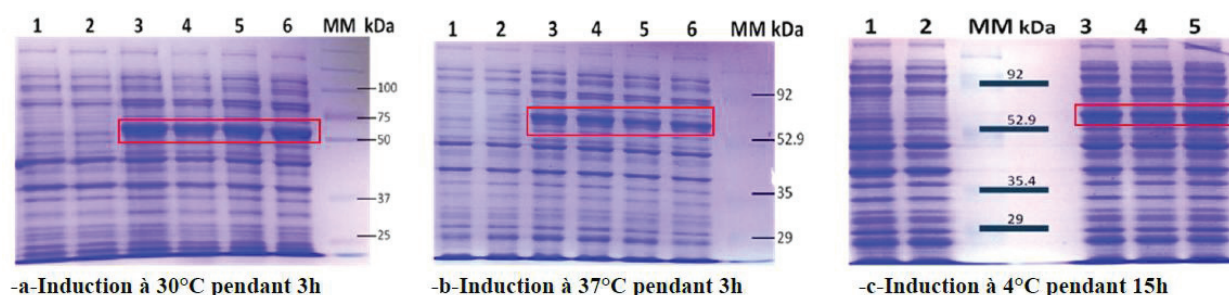
Dans un premier temps la construction pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal a été utilisée dans le but de l'exprimer dans la souche d'*E. coli* BL21pRIPL (cf. Matériel et Méthodes), et de purifier la protéine pour étudier son activité enzymatique.

##### 3.2.1.1. Expression de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal :

L'induction des protéines, pour différentes conditions de temps et de température, a été réalisée pour optimiser les conditions de l'expression. Chaque condition d'expression a été analysée par SDS-PAGE et les résultats sont montrés dans la **figure 107**. Dans les pistes 3 à 6 on remarque la présence d'une bande protéique supplémentaire aux alentours de 55 kDa (masse moléculaire attendue de la protéine), alors que cette bande est absente dans les pistes 1 et 2 (qui représentent le vecteur vide), ce qui confirme que la bande de 55 kDa correspond à la protéine ATGL. Une forte expression de cette protéine est observée dans le cas d'induction à



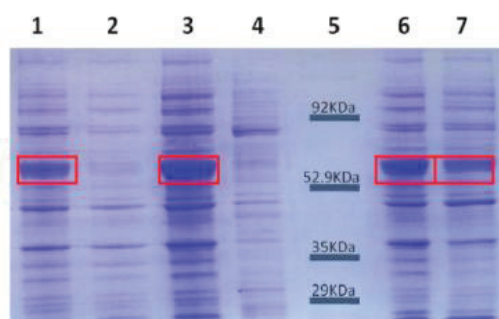
30°C pendant 3 h et cette expression est moins forte dans les conditions d'induction à 37°C et à 4°C. On a donc décidé de faire les inductions de l'expression des protéines à 30°C pendant 3 h pour la suite des études.



**Figure 107 :** SDS-PAGE montrant les expressions de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal exprimée dans la souche BL21pRIPL dans des conditions de température et de temps différentes. **Piste 1 et 2 :** contrôle négatif (cellules transformées par le vecteur pET28b-vide) ; **piste 3 à 6 :** clones transformés par le vecteur pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal ; **MM :** Marqueur de masse moléculaire. La case rouge indique la bande supplémentaire observée.

### 3.2.1.2. Purification de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal :

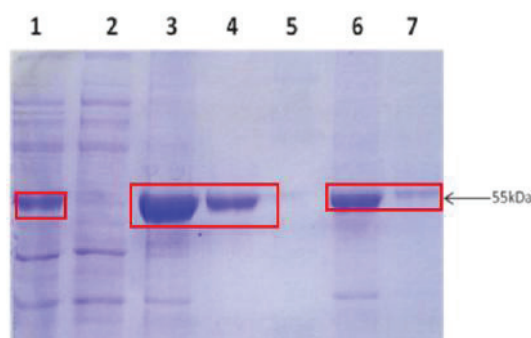
Nous avons voulu purifier la protéine *MmATGL* dans des conditions natives pour pouvoir étudier son activité catalytique par la suite. La fraction soluble issue des culots bactériens a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel IDA. La fraction purifiée et d'autres fractions ont été analysées par SDS-PAGE (**Figure 108**). On retrouve une bande protéique d'environ 55 kDa (cf. **Figure 107**) dans la piste 1 (contrôle positif), bande qui est absente dans la piste 2 (contrôle négatif) ce qui montre que c'est bien la protéine d'intérêt. De plus, on voit la même bande dans la piste 3 (lysate cellulaire), ce qui indique que la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal est soluble dans ces conditions. Par contre, après la purification, dans la piste 4 (fraction purifiée) on ne retrouve pas cette bande, correspondant à la protéine ATGL, ce qui montre que la protéine n'a pas d'affinité pour la colonne dans les conditions testées. Effectivement on retrouve la protéine dans la fraction non liée (piste 6) et la fraction de lavage (piste 7), ce qui valide l'idée que la protéine n'a pas été retenue par la colonne d'affinité.



**Figure 108 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification en conditions natives de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal. **Piste 1 :** contrôle positif, extrait protéique total de cellules transformées par le vecteur pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal ; **piste 2 :** contrôle négatif (cellules transformées par le vecteur pET28b-vide) ; **piste 3 :** lysat ; **piste 4 :** fraction purifiée ; **piste 5 :** marqueur de masse moléculaire ; **piste 6 :** fraction non liée ; **piste 7 :** fraction de lavage. La case rouge indique la bande enrichie.



D'après ces résultats deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette incapacité de la protéine à interagir avec la résine : (i) la protéine n'avait pas d'étiquette 6xHis suite à une erreur de séquençage ou de clonage, (ii) l'étiquette serait non accessible à cause du repliement de la protéine. Pour tester ces hypothèses une purification en conditions dénaturantes a été réalisée sur la fraction insoluble obtenue après lyse des cellules. Le culot obtenu après centrifugation a été solubilisé dans un tampon dénaturant contenant de l'urée 8 M, puis centrifugé pour séparer les protéines solubilisées des débris cellulaire. La purification a été réalisée de la même façon que celle du surnageant, tous les tampons contenant 8 M d'urée. Les différents échantillons ont été analysés par SDS-PAGE (**Figure 109**).



**Figure 109** : Analyse par SDS-PAGE de la purification en conditions dénaturantes sur résine de nickel de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal. **Piste 1** : contrôle positif (extrait protéique venant de cellules transformées par le vecteur pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal) ; **piste 2** : contrôle négatif (cellules transformées par le vecteur pET28b-vide) ; **piste 3** : lysat cellulaire ; **piste 4** : fraction purifiée ; **piste 5** : marqueur de masse moléculaire ; **piste 6** : fraction non éluée ; **piste 7** : premier lavage. La case rouge indique la bande enrichie.

Dans la fraction purifiée en conditions dénaturantes (**Figure 109**, piste 4) on voit bien une bande protéique qui correspond à la masse moléculaire de la protéine *MmATGL* (55 kDa). La protéine dénaturée a donc pu s'accrocher à la résine ce qui prouve la fonctionnalité de l'étiquette, et rend donc probable l'hypothèse de l'inaccessibilité de l'étiquette 6xHis en N-terminal de la protéine en conditions natives. Les résultats de la purification de *MmATGL* en conditions dénaturantes sont présentés dans le **tableau 4**. Environ 1,7 mg de protéine quasi-pure sont obtenus avec un rendement d'environ 15 %.

**Tableau 4** : Bilan de la purification de *MmATGL* en conditions dénaturantes. Les lavages 1, 2, 3 et 4 correspondent aux fractions successives de lavage par le tampon contenant 8 M d'urée.

Echantillon	Lysat	Fraction non liée	Lavage 1	Lavage 2	Lavage 3	Lavage 4	Fraction purifiée
<b>Protéines (mg)</b>	11,3	7,4	0,6	0,21	0	0	1,7
<b>Rendement (%)</b>	100	70	6	2	0	0	15

La fraction protéique purifiée est dénaturée par l'urée, et des étapes supplémentaires de renaturation seront requises pour tester l'activité enzymatique de la protéine. Avant de s'investir dans l'optimisation des techniques de renaturation, on a voulu tester d'autres

techniques de purification en conditions natives plus simples que la renaturation en espérant avoir la protéine native plus rapidement et en moins d'étapes.

Par conséquence, d'autres purifications en conditions natives ont été testées, en utilisant la propriété de la présence de l'étiquette 6xHis en N-terminal de la protéine ATGL par chromatographie d'affinité sur deux types de colonne : colonne de nickel TED et colonne de cobalt. Les résultats (non présentés) ont montré que la protéine est toujours obtenue dans la fraction non liée à la résine, ce qui renforce l'hypothèse de l'inaccessibilité de l'étiquette 6xHis dans la protéine native.

Ensuite, tout en sachant que la protéine ATGL agit à l'interface lipidique, on peut supposer qu'elle contient des régions hydrophobes qui lui permettent d'interagir avec les lipides substrats. Nous avons effectué la purification de l'ATGL par chromatographie hydrophobe sur colonne d'Octyl-Sepharose, utilisée au laboratoire avec succès pour la purification des PLD. Cependant à haute concentration de sels (NaCl 3 M, concentration de sel requise au début de la purification), l'ATGL précipite et ne peut donc être purifiée par cette méthode.

La purification de l'ATGL murine étiquetée en N-terminal a été également testée en utilisant une chromatographie échangeuse d'ions sur colonne DEAE Sepharose (CL-6B) à pH 7,5. Le problème rencontré dans cette technique est que l'ATGL précipite à une concentration de sel inférieur à 100 mM, et qu'à cette concentration, l'enzyme ne s'accroche pas sur la colonne échangeuse d'anions, et se trouve dans la fraction non liée.

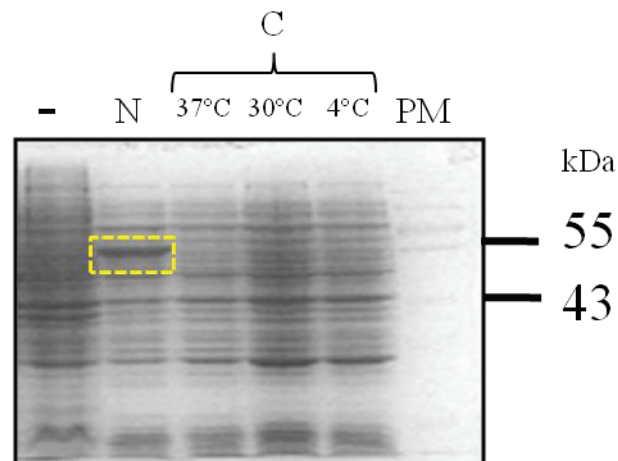
Au vu de ces résultats, il apparaît clair que la purification de l'ATGL étiquetée en N-terminal n'est possible que dans des conditions dénaturantes par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel, avec l'hypothèse qu'en conditions non dénaturantes, l'étiquette en N-terminal se trouve inaccessible à la résine de nickel. Pour cela nous avons testé l'expression et la purification de la *Mm*ATGL étiquetée cette fois en C-terminal, dans des conditions natives.

### **3.2.2. *Mm*ATGL étiquetée 6xHis en C-terminal :**

#### **3.2.2.1. Expression de la protéine *Mm*ATGL 6xHis C-terminal :**

Dans un premier temps, pour trouver les conditions optimales de l'expression, l'expression de la protéine a été testée, à différentes conditions de temps et de température : 3 h à 37°C, 3 h à 30°C et 15 h à 4°C. Les cellules induites (IPTG 1 mM) ont été ensuite analysées par SDS-PAGE (**Figure 110**).

Dans toutes les conditions testées, aucune expression de l'ATGL 6xHis C-terminal n'a été observée. Seule la construction étiquetée en N-terminal est exprimée (**Figure 110**, piste N). Il est à noter que la construction sans étiquette de l'ATGL a été également testée, sans qu'aucune expression soit observée (résultats non présentés).



**Figure 110 :** SDS-PAGE montrant les expressions de la protéine *MmATGL* 6xHis C-terminal exprimée dans la souche BL21pRIPL dans des conditions de température et de temps différentes. (-) : contrôle négatif (cellules transformées par le vecteur pET28b-vide) ; N : clones transformés par le vecteur pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal (contrôle positif d'expression) ; C : clones transformés par le vecteur pET28b-*MmATGL* 6xHis C-terminal ; MM : Marqueur de masse moléculaire. La case jaune indique la bande protéique enrichie.

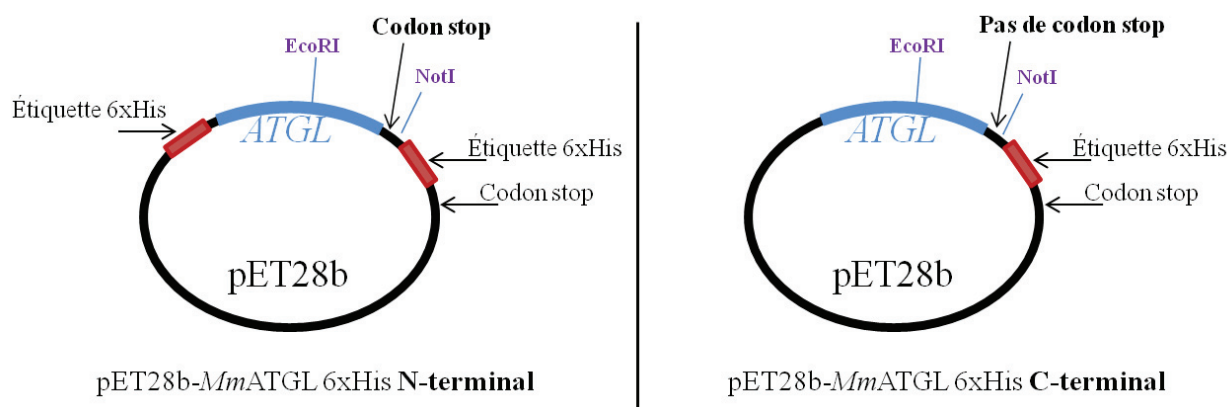
Les résultats d'expression des différentes constructions ont donc montré que la construction étiquetée en N-terminal est exprimée et soluble, mais l'étiquette est non accessible, alors que la construction en C-terminal n'est pas exprimée. On peut supposer que la présence de l'étiquette en N-terminal facilite la fixation des ribosomes et la traduction de l'ARNm.

### 3.2.3. Protéine *MmATGL* étiquetée 6xHis en N-terminal et en C-terminal :

#### 3.2.3.1. Préparation de la construction pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal et en C-terminal :

Au vu de ces résultats, une autre construction a donc été réalisée avec à la fois une étiquette en N-terminal et en C-terminal avec l'espoir d'avoir une protéine recombinante qui soit soluble et qui soit retenue sur la colonne de nickel. Pour faire cette construction nous avons utilisé la présence d'un site *EcoRI* au milieu de la séquence de l'ADNc, codant l'ATGL, permettant d'échanger des domaines entre les constructions étiquetées en N-terminal et en C-terminal. Les deux plasmides, pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal et pET28b-*MmATGL* 6xHis C-terminal ont été digérés par les deux enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI* (**Figure 111**).

Suite à la digestion par *EcoRI* et *NotI*, deux fragments ont été générés pour chaque plasmide. Pour le plasmide pET28b-*MmATGL* 6xHis C-terminal (**Figure 111**, à droite) le petit fragment généré après digestion, ne contenant pas de codon stop, a été inséré à la place du petit fragment issu de la digestion du plasmide pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal (**Figure 111**, à gauche). Cette ligation permettra donc d'enlever le codon stop de la construction pET28b-*MmATGL* 6xHis N-terminal (**Figure 111**, à gauche) et d'avoir l'étiquette 6xHis en C-terminal fusionnée dans le cadre de lecture.



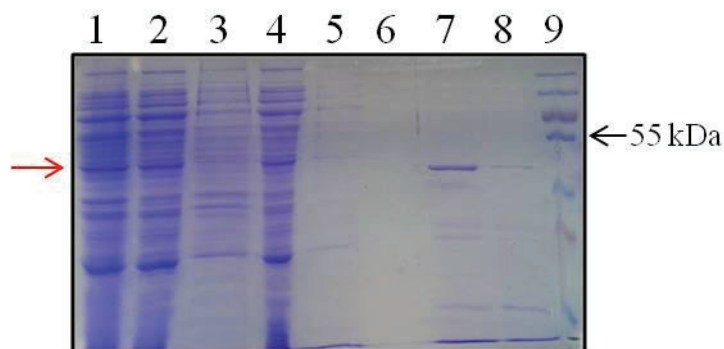
**Figure 111 :** Représentation schématique des deux plasmides pET28b-MmATGL 6xHis N-terminal (à gauche) et pET28b-MmATGL 6xHis C-terminal (à droite) avec la position des sites de restriction EcoRI, NotI, des codant stop, et des étiquettes 6xHis. La partie bleue représente l'ADNc codant l'ATGL, et la partie rouge représente l'étiquette 6xHis.

Pour éviter sa religation sur lui-même, le grand fragment, issu de la digestion du plasmide pET28b-MmATGL 6xHis N-terminal, a été également déphosphorylé après la digestion par EcoRI et NotI. La digestion a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et les fragments appropriés ont été séparés et purifiés par extraction sur gel d'agarose et puis quantifiés par spectrophotométrie. La ligation a été effectuée par la T4 ADN ligase pour 1 h à température ambiante, et le plasmide fusionné appelé pET28b-MmATGL 6xHis N-terminal et C-terminal a été transformé dans les cellules Top10 qui ont été étalées sur boîte de Petri contenant du LB et de la Kanamycine. Le criblage des clones positifs contenant le plasmide a été fait par PCR en utilisant les amorces AN028 et AN061. Un des clones positifs a été mis en culture et le plasmide a été purifié par midi-préparation et quantifié par spectrophotométrie puis séquencé pour vérification.

### 3.2.3.2. Expression et purification de la protéine *MmATGL* étiquetée 6xHis en N-terminal et en C-terminal :

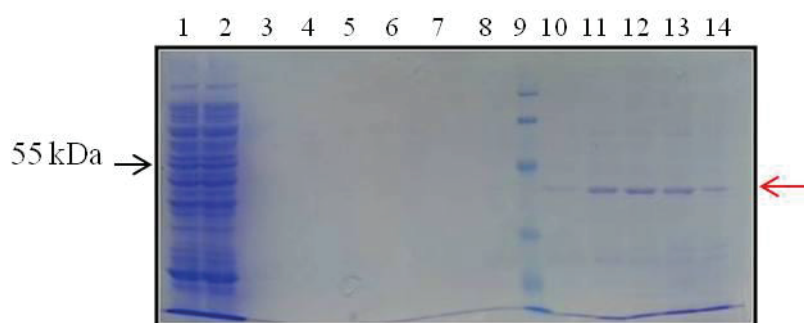
Les tests d'expression dans la souche BL21 ont montré que la protéine s'exprime dans *E. coli*, dans les mêmes conditions que la *MmATGL* 6xHis N-terminal, et qu'une partie de la protéine se trouve dans la fraction soluble (résultats non présentés). On a donc essayé de voir si elle s'accroche sur la colonne de nickel.

Nous avons voulu purifier cette protéine en premier temps dans des conditions natives pour pouvoir étudier son activité enzymatique. La fraction soluble issue des culots bactériens lysés par sonication, a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel TED. La fraction purifiée et d'autres fractions ont été analysées par SDS-PAGE (**Figure 112**).



**Figure 112 :** Analyse par SDS-PAGE de la purification en conditions natives sur colonne de nickel de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal. **Piste 1 :** cellules entières induites ; **piste 2 :** lysat cellulaire ; **piste 3 :** contrôle négatif (cellules transformées par le vecteur pET28b-vide) ; **piste 4 :** fraction non liée ; **piste 5 :** fraction de lavage ; **piste 6, 7 et 8 :** fraction purifiée ; **piste 9 :** marqueur de masse moléculaire. La flèche rouge indique la position de la protéine purifiée.

Les résultats montrent qu'une protéine enrichie est purifiée mais de masse moléculaire inférieure à 55 kDa (masse moléculaire théorique de l'ATGL) (**Figure 112**, piste 7). Pour affiner d'avantage cette purification de l'ATGL, un gradient d'imidazole a été appliqué durant l'élution de la protéine de la colonne de nickel. Les différents échantillons ont été analysés par la suite par SDS-PAGE (**Figure 113**).



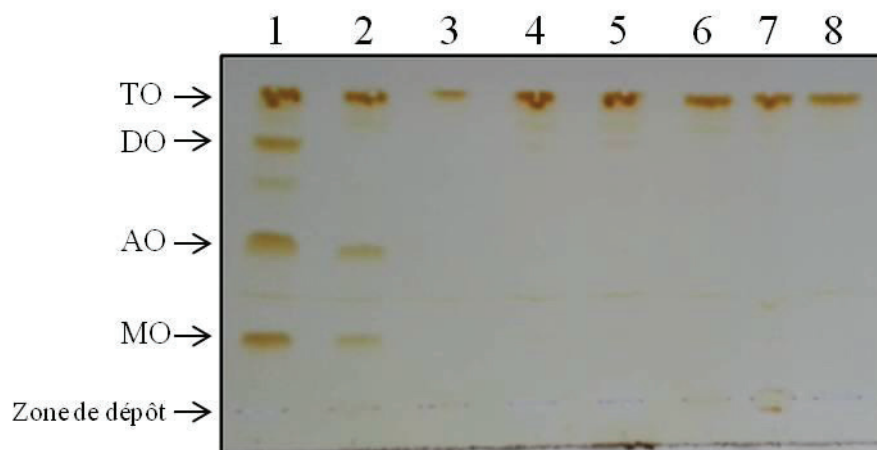
**Figure 113 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification en conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal en utilisant un gradient d'imidazole. **Piste 1 :** fraction soluble ; **piste 2 :** fraction non liée ; **piste 3 :** fraction de lavage ; **piste 4 à 8 :** élution avec gradient d'imidazole correspondant respectivement à 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 et 10 mM d'imidazole ; **piste 9 :** marqueur de masse moléculaire ; **piste 10 à 14 :** élution avec gradient d'imidazole correspondant respectivement à 20, 50, 100, 250 et 250 mM d'imidazole. La flèche rouge indique la position de la protéine purifiée.

D'après ces résultats, on remarque qu'on a toujours le problème de la masse moléculaire de la protéine purifiée qui n'est pas en accord avec la masse moléculaire théorique de l'ATGL de 55 kDa. Pour cela on a vérifié cette protéine par deux types de test : par test d'activité enzymatique et par immunoempreinte.

### 3.2.3.3. Analyse de l'activité de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-TED :

Nous avons testé, dans un premier temps, l'activité lipase de la fraction purifiée en utilisant une émulsion composée de trioléine / PC (0,3 mM / 45  $\mu$ M), en présence de 5 % de BSA. Après la réaction, les produits de la lipolyse ont été extraits et analysés par CCM

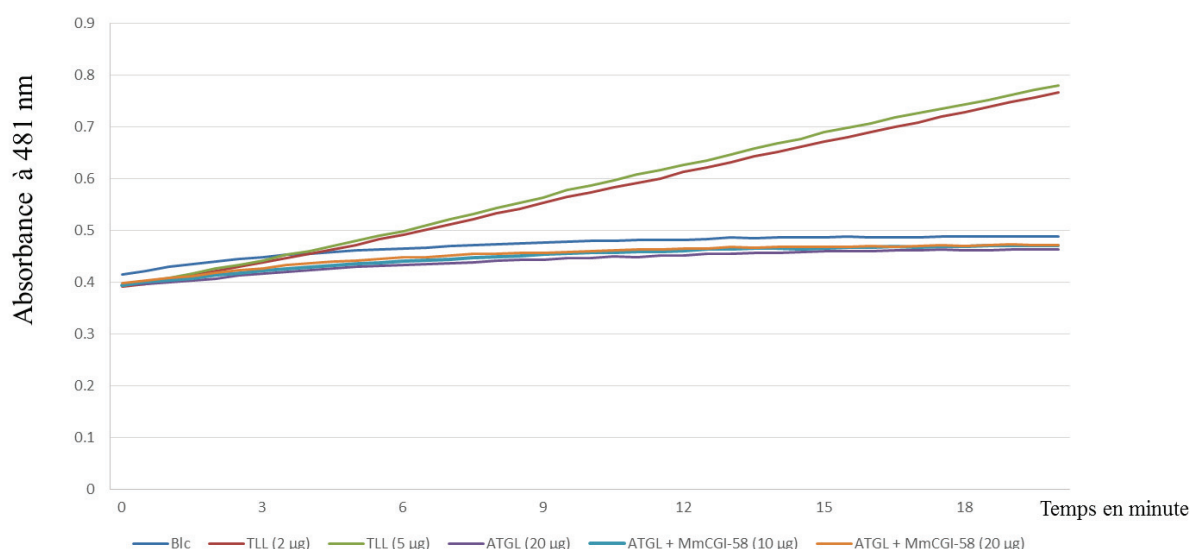
(**Figure 115**). La TLL a été utilisée comme contrôle positif dans les mêmes conditions expérimentales. Aucun produit de lipolyse n'est apparent dans le chromatogramme en utilisant 4, 10 ou 13  $\mu\text{g}$  de la protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-TED (**Figure 115**, pistes 4-6), même en présence de la protéine CGI-58 (**Figure 115**, piste 7 et 8). Par contre, on observe une tache correspondante à l'acide oléique (AO) issue de l'hydrolyse de la trioléine par la TLL utilisée comme contrôle positif (**Figure 115**, piste 2).



**Figure 115** : Analyse par CCM de l'activité triglycéride lipase de la protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-TED. **Piste 1** : contrôle de migration des lipides (TO, DO, AO et MO) ; **piste 2** : extrait lipidique du contrôle positif fait en présence de la TLL ; **piste 3** : extrait lipidique du contrôle négatif fait sans enzyme ; **piste 4, 5 et 6** : extrait lipidique du test enzymatique fait en présence de 4, 10 ou 13  $\mu\text{g}$ , respectivement, de protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-TED ; **piste 7 et 8** : extrait lipidique du test enzymatique fait en présence de 10  $\mu\text{g}$  de protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-TED, en présence de 10  $\mu\text{g}$  de la protéine CGI-58 murine ou de pante, respectivement.

Nous avons testé également, l'activité lipasique de la fraction d'ATGL purifiée en utilisant un MG couplé au nitrobenzofurazan (NBD), NBD-MG. Le traitement par ultrasons, en présence de phospholipides, conduit à l'incorporation du NBD-MG dans des micelles avec un changement de ses propriétés spectrales (changement de couleur, du jaune au rouge pourpre, avec une absorbance maximale à 550 nm). La libération enzymatique, par la lipase, du NBD-acide gras et la dissociation des micelles conduit à l'apparition des caractéristiques spectrales du substrat libre (changement de couleur du rouge pourpre au jaune avec une absorbance maximale à 481 nm). Les cinétiques enzymatiques effectuées en présence de la TLL (contrôle positif), de l'ATGL seule ou avec la protéine CGI-58 sont présentées dans la **figure 116**.

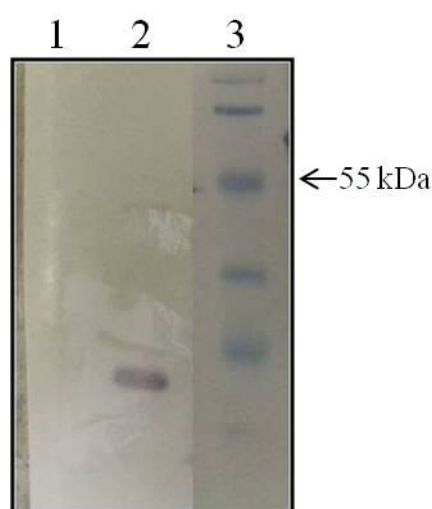




**Figure 116 :** Mesure par absorbance à 481 nm de l'activité lipasique de la protéine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-TED. (**Blc**) : contrôle négatif réalisé sans enzyme.

D'après les résultats de ce test enzymatique, on confirme là encore que cette fraction purifiée d'ATGL n'a pas d'activité enzymatique même en présence de son cofacteur la protéine CGI-58. Ce résultat a causé un grand doute sur l'authenticité de cette protéine purifiée, et donc une analyse de l'authenticité de la protéine a été entreprise pour clarifier les choses.

Une immunoempreinte (**Figure 114**) utilisant des anticorps anti poly-histidines a été effectuée sur les fractions purifiées afin de vérifier la présence de l'étiquette 6xHis et par conséquent l'authenticité de la protéine ATGL. On peut voir que dans la piste 1 de la **figure 114** que l'échantillon purifié n'est pas reconnu par les anticorps anti poly-histidines à la différence du contrôle positif (*MmCGI-58* 6xHis N-terminal, **Figure 114**, piste 2).



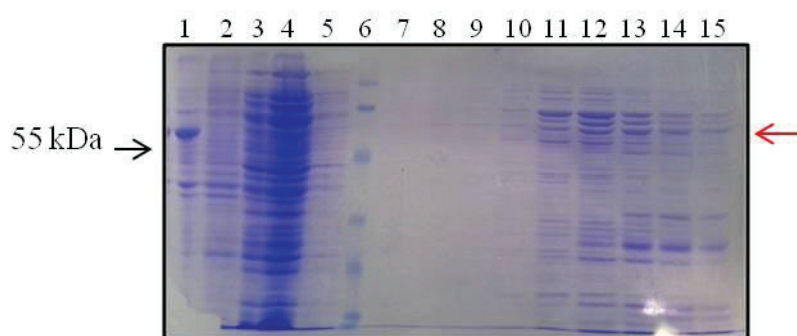
**Figure 114 :** Analyse par immunoempreinte, en utilisant des anticorps anti poly-histidines, de l'identité de la protéine purifiée dans des conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-TED. **Piste 1 :** fraction purifiée de la purification de *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal ; **piste 2 :** contrôle positif (protéine avec une étiquette 6xHis purifiée au sein du laboratoire) ; **piste 3 :** marqueur de la masse moléculaire.

Il apparaît clair que ces analyses biochimiques effectuées, confirment que la bande protéique vue sur SDS-PAGE (cf. **Figure 112 et 113**), de la fraction purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel Ni-TED, ne correspond pas à une protéine d'ATGL fonctionnelle. Pour cette raison, on a réessayé en utilisant un autre type de résine, le cobalt, qui a donné de meilleurs résultats dans le cas de la protéine CGI-58 (voir la partie de la purification de la protéine CGI-58) comparé aux résines Ni-TED ou Ni-IDA.

#### 3.2.3.4. Purification de *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt :

Le cobalt comme le nickel permet la fixation d'une étiquette poly-histidines et son élution par l'ajout de quantités croissantes d'imidazole. En utilisant le même principe et le même protocole de purification sur nickel, une purification en conditions natives par chromatographie d'affinité sur résine de cobalt a été entreprise. En premier lieu, une élution avec un gradient d'imidazole a été faite pour optimiser la concentration optimale d'imidazole pour le lavage de la colonne et l'élimination de la plus grande partie des contaminants, sans éluer l'ATGL.

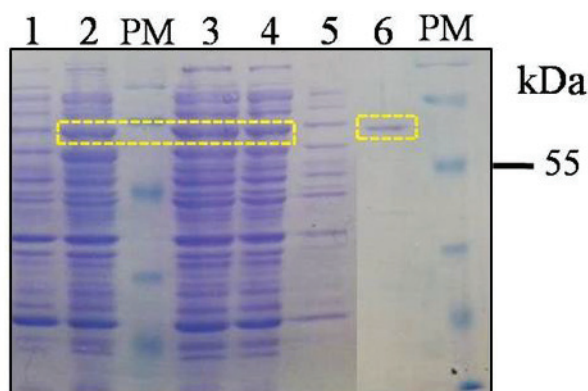
La fraction soluble, issue des culots bactériens, a été incubée avec la résine de cobalt pour 1 h à 4°C sous agitation, puis chargée sur une colonne vide pour décanter la solution, et séparer la fraction non liée de la fraction liée la résine de cobalt, qui est récupérée par gravité. Une étape de lavage de 50 mL avec le même tampon de lyse a été réalisée pour éliminer d'éventuels restes de contaminants. L'élution a été effectuée avec un gradient (en escalier) de concentration d'imidazole de 3 à 250 mM. Les fractions purifiées et d'autres fractions ont été analysées par SDS-PAGE (**Figure 117**). D'après ces résultats, on peut voir une bande protéique qui pourrait être l'ATGL avec une masse moléculaire aux alentours de 55 kDa (**Figure 117**, flèche rouge), et on voit qu'un lavage avec une concentration de 20 mM d'imidazole (**Figure 117**, piste 11) pourrait améliorer la pureté de l'échantillon.



**Figure 117 :** Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal en utilisant un gradient d'imidazole. **Piste 1** : cellules entières induites ; **piste 2** : contrôle négatif (cellules transformées par le vecteur pET28b-vide) ; **piste 3** : fraction soluble ; **piste 4** : fraction non liée ; **piste 5** : fraction de lavage ; **piste 6** : marqueur de masse moléculaire ; **pistes 7 à 15** : élution avec gradient d'imidazole correspondant respectivement à 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 250 et 250 mM d'imidazole. La flèche rouge indique la position de l'ATGL.

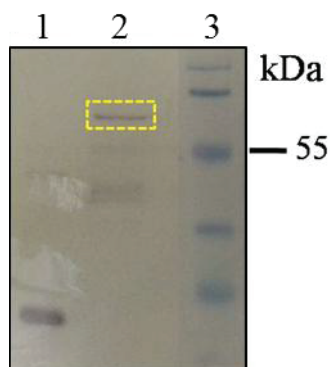
Une purification de l'ATGL en conditions natives a été entreprise à partir d'un culot bactérien obtenu à partir de 2 L de culture. La fraction soluble, issue du culot bactérien, a été

incubée avec la résine de cobalt pour 2 h à 4°C sous agitation, ensuite la résine a subi une étape de lavage avec 20 mL du même tampon de lyse contenant 20 mM d’imidazole pour éliminer les contaminants. L’élution a été effectuée avec le tampon de lyse contenant 250 mM imidazole, puis une étape de chromatographie d’exclusion sur une colonne PD10 a été entreprise pour séparer la protéine d’intérêt de l’imidazole et autres molécules. La fraction purifiée et les autres fractions ont été analysées par SDS-PAGE (**Figure 118**)



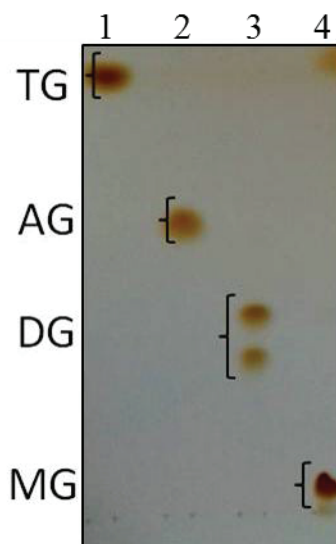
**Figure 118** : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives par chromatographie d’affinité sur colonne de cobalt de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal, après lavage avec 20 mM d’imidazole. **Piste 1** : contrôle négatif (cellules transformées par le vecteur pET28b-vide) ; **piste 2** : cellules entières induites ; **piste 3** : fraction soluble ; **piste 4** : fraction non liée ; **piste 5** : fraction de lavage ; **piste 6** : fraction purifiée ; **PM** : Marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la présence de la protéine *MmATGL*.

En utilisant ce protocole employant la résine de cobalt, une protéine de masse moléculaire plus grande que celle purifiée avec le nickel a été obtenue (**Figure 118**, piste 6), cette bande a été vérifiée par immunoempreinte (**Figure 119**) en utilisant un anticorps anti-poly-histidines. On voit clairement l’apparition d’une bande protéique au même niveau que de la protéine purifiée (**Figure 119**, piste 2), ce qui montre la présence de l’ATGL étiquetée 6xHis en N-terminal et C-terminal dans cette fraction.



**Figure 119** : Analyse par immunoempreinte de l’identité de la protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal purifiée dans des conditions natives à partir de la résine de cobalt, analyse faite en utilisant des anticorps anti poly-histidines. **Piste 1** : contrôle positif (protéine avec une étiquette 6xHis purifiée au sein du laboratoire) ; **Piste 2** : protéine *MmATGL* 6xHis N-terminal et C-terminal purifiée ; **Piste 3** : marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la présence de la protéine *MmATGL*.

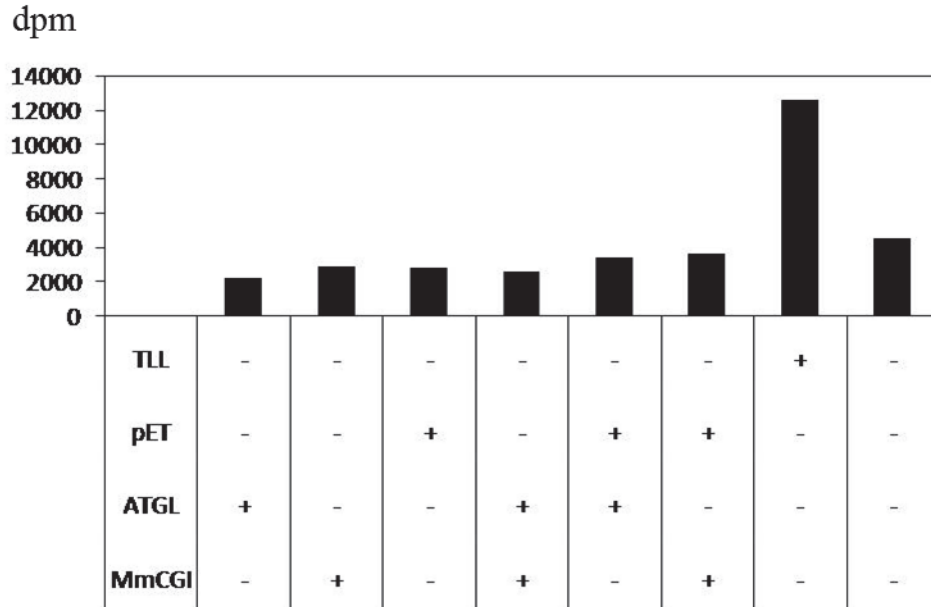
Des tests enzymatiques sur la fraction purifiée de l'ATGL ont été entrepris, en utilisant des substrats lipidiques radiomarqués. Après avoir incubé l'ATGL avec des micelles de trioléine / PC pendant 1 h à 37°C, les produits de lipolyse ont été extraits et séparés par CCM. Ensuite la silice au niveau de la migration de l'acide oléique (AO) (**Figure 120**) a été grattée pour chaque échantillon et mélangée avec le liquide de scintillation pour compter le nombre de désintégration par minute (dpm) trouvé dans chaque échantillon.



**Figure 120 :** Contrôle de la migration des différents réactifs et produits du test triglycéride lipase. **Piste 1 :** trioléine ; **piste 2 :** acide oléique ; **piste 3 :** dioléine ; **piste 4 :** monooléine.

Plusieurs tests ont été faits en utilisant l'enzyme TLL, comme contrôle positif, l'ATGL, la protéine CGI-58, et l'extrait des cellules BL21 transformées par le vecteur pET28b-vide comme contrôle négatif. Les différentes combinaisons et résultats sont récapitulés dans la **figure 121**. A chaque fois 100 ng de l'enzyme TLL, 10 µg d'ATGL et/ou CGI-58 ont été ajoutés.

D'après ces tests enzymatiques, aucune activité TG lipase n'a été détectée pour l'ATGL même en présence de son cofacteur, la protéine CGI-58. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'absence de cette activité ; le protocole utilisé pour la purification pourrait dénaturer ou diminuer l'activité de la protéine, pour cela des tests d'activité sur des extraits bruts de cellules exprimant l'ATGL ont été effectués pour vérifier cette hypothèse, mais aucune activité n'a été détectée dans ces fractions. Une autre hypothèse est que la protéine recombinante testée comporte deux étiquettes 6xHis en N-terminal et C-terminal, peut-être que ces deux étiquettes affectent le repliement de la protéine, pour cela on a testé des extraits bruts de la construction étiquetée par une seule étiquette 6xHis en N-terminal (construction exprimée mais non retenue sur colonne d'affinité), mais là encore aucune activité n'a été détectée.



**Figure 122 :** Mesure de l'activité lipase de la protéine *MmATGL* par comptage des dpm totaux retrouvés dans la fraction acide oléique purifiée par CCM.

Il ne faut pas oublier que la protéine ATGL n'a jamais été purifiée à grande échelle ni dans un système procaryotique ni dans un système eucaryotique et que tous les tests effectués ont été faits sur des extraits cellulaires bruts issus de cellules de Mammifères. Dans cette étude, on a voulu trouver un système rapide et simple pour exprimer et purifier l'ATGL, on a testé les deux systèmes eucaryotique (*P. pastoris*) et procaryotique (*E. coli*), on a réussi à avoir, pour la première fois, la protéine dans *E. coli* et la purifier par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt, mais on n'a pas réussi à détecter d'activité enzymatique. Il semble que les modifications post-traductionnelles de l'ATGL dans un système eucaryotique soient indispensables pour son activité enzymatique, et pour cela il faudrait réinvestir dans l'expression et la purification de la protéine à partir des levures *P. pastoris* en utilisant d'autres plasmides disponibles pour ce système autre que le pGAPZαA.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

A ce jour, le rôle de la protéine CGI-58, chez les mammifères et les plantes, n'est pas clair, de même que son activité enzymatique. Dans le but de mieux comprendre le rôle de la protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique, nous avons développé une nouvelle stratégie, en générant de nouveaux plasmides qui nous ont permis, avec également le plasmide pET28b(+), d'exprimer et de purifier la protéine CGI-58 de souris et de plantes ainsi que l'ATGL murine. Ces protéines ont été exprimées dans différentes souches d'*E. coli*, pour tester leur activité enzymatique *in vitro* en utilisant des substrats radiomarqués. De plus, grâce à ces plasmides générés et à différentes souches bactériennes, nous avons mis en place un système qui nous a permis de tester également, *in vivo*, et toujours dans *E. coli*, l'activité acyltransférase (LPAAT et/ou LPGAT) de la protéine CGI-58.

Les deux protéines CGI-58 de mammifère et de plante, avec une étiquette 6xHis en N-terminal, ont été exprimées dans un système procaryotique et purifiées, en conditions natives, par chromatographie d'affinité sur résine de cobalt. Nous avons aussi réussi à tester un système chez *E. coli* qui permette le criblage *in vivo* soit de l'activité LPAAT en utilisant la complémentation de la souche SM2-1, soit de l'activité LPGAT en utilisant la complémentation de la souche MN7. En utilisant les fractions protéiques purifiées ainsi que les deux systèmes de complémentation, nous avons pu montrer aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* que la protéine CGI-58 de plante, ainsi que celle de mammifère, ne possèdent ni activité LPAAT ni activité LPGAT, et que la protéine CGI-58 de plante est dépourvue d'activité TG lipase ou phospholipase. Cependant nous avons montré, en analysant par chromatographie sur couche mince et par spectrométrie de masse des extraits lipidiques des différentes souches d'*E. coli* exprimant la protéine CGI-58, que contrairement à la protéine de mammifères, l'expression de la protéine de plantes, tronquée en N-terminal de la séquence peptidique putative d'adressage vers les chloroplastes, aboutit à une diminution de 40 % du taux de PG dans les différentes souches testées. Nous avons montré également que la mutation de la sérine Ser199, ainsi que la mutation de l'histidine His379 de la triade catalytique, restaure le phénotype sauvage. Ces résultats nous ont permis de proposer que la protéine CGI-58 de plantes soit impliquée, *via* sa triade catalytique, dans le métabolisme du PG.

Il sera donc intéressant, en utilisant cette technique, de cribler tous les mutants possibles de la protéine CGI-58 pour identifier les acides aminés responsables et/ou affectant l'activité catalytique de la protéine, afin d'obtenir des données structurales sur la protéine, et de cribler aussi des activateurs et/ou inhibiteurs de la protéine afin d'étudier son mécanisme enzymatique.

Nous n'avons pas réussi, en utilisant un PG radiomarqué, à détecter *in vitro* une activité PG hydrolase de la protéine CGI-58. Dans le but de confirmer l'hypothèse que la diminution des taux de PG observée est bien due à une activité PG hydrolase de la protéine ou sinon à une activité hydrolase sur l'un des précurseurs de synthèse du PG, il serait donc intéressant de



quantifier par exemple par spectrométrie de masse, les produits d'hydrolyse ou de synthèse du PG comme les acides gras, le CDP-diacylglycérol-glycérol-3-phosphate ou les cardiolipines, respectivement.

Dans le cas où la protéine CGI-58 posséderait une activité PG hydrolase, il serait intéressant de tester si la protéine a une préférence d'hydrolyse d'une seule ou plusieurs espèces de PG, en détectant par spectrométrie de masse les modifications des taux de chaque espèce de PG.

Aucune activité, ni LPAAT ni LPGAT ni hydrolase, n'a été détectée pour la protéine CGI-58 de mammifère exprimée chez *E. coli*. Vu que la sérine putative de la triade catalytique y est remplacée par une asparagine dans la protéine de mammifère, cela pourrait expliquer l'absence détectée d'activité hydrolase. Mais il serait aussi intéressant de tester si l'absence d'activité n'est pas due à l'expression de la protéine de mammifère dans un système procaryotique, qui n'autorise pas certaines modifications post-traductionnelles par exemple. Il serait judicieux de tester le profil lipidique obtenu après expression dans un système eucaryotique, comme la levure *P. pastoris*.

La protéine CGI-58 a été aussi mise en évidence comme un activateur de l'ATGL, et plusieurs études sont actuellement focalisées sur l'implication de l'ATGL et de son cofacteur dans des pathologies liées au métabolisme des lipides. Mais, on ignore jusqu'à ce jour les caractéristiques biochimiques de ces deux protéines ainsi que le mécanisme d'activation de l'ATGL par la protéine CGI-58. Ce projet de recherche avait initialement pour but d'approfondir nos connaissances sur la libération des acides gras du tissu adipeux et d'étudier les caractéristiques biochimiques ainsi que les relations structure-fonction de l'ATGL et de la protéine CGI-58. Plusieurs étapes ont été requises, dont la première a été celle de l'expression et la purification de l'ATGL.

En utilisant donc différentes approches et différents systèmes d'expression, on a réussi à exprimer l'ATGL dans *E. coli*, et à la purifier, pour la première fois, à grande échelle par chromatographie d'affinité sur résine de cobalt et en étiquetant la protéine par une étiquette 6xHis sur les deux positions N-terminale et C-terminale en même temps. Attendu que l'on n'a pas réussi à détecter l'activité TG lipase sur cette fraction purifiée, il sera intéressant de l'utiliser pour des tests de prédiction ou de détermination de la structure de la protéine. La protéine pourrait être utilisée soit seule soit en interaction avec la protéine CGI-58 de mammifère ou de plantes, en utilisant par exemple la cristallographie, qui est actuellement la technique la plus résolutive, ou encore la résonance magnétique nucléaire, qui permettra d'obtenir des informations sur la dynamique des arrangements conformationnels par mesure des temps de relaxation, des temps de corrélation, et des vitesses d'échange chimique.

Il sera aussi intéressant de tester l'expression de l'ATGL murine ou de plante (SDP1) dans le système eucaryotique, *P. pastoris*, mais en utilisant le plasmide pGAZB au lieu du plasmide pGAPZαA, utilisé dans cette étude, vu que de meilleurs résultats ont été obtenus depuis au sein du laboratoire pour l'expression d'autres lipases avec ce plasmide pGAZB. L'objectif principal avait été d'obtenir une protéine purifiée et active qui permettrait par la suite la caractérisation de l'interaction de l'ATGL seule ou le complexe ATGL/CGI-58 avec

l'interface lipidique, en utilisant par exemple, la technique des films monomoléculaires qui permettent d'effectuer une étude comparative de l'adsorption / pénétration de ces protéines sur une monocouche lipidique pré-étalée à l'interface air/eau.

La région N-terminale de l'ATGL révèle l'existence d'un domaine *patatin* et le pentapeptide G<sub>45</sub>-X-S<sub>47</sub>-X-G<sub>49</sub> (dans laquelle X représente un acide aminé quelconque) contenant le résidu Ser catalytique potentiel trouvé dans la séquence des lipases. L'ATGL fonctionne-t-elle avec une diade catalytique comme celle trouvée chez les PLA<sub>2</sub> cytosoliques ou une triade catalytique Ser-Asp/Glu-His comme celle trouvée chez les lipases ? Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette enzyme lipolytique et en utilisant la mutagenèse dirigée, les acides aminés impliqués dans la catalyse et/ou l'interaction avec l'interface lipidique pourraient être ainsi identifiés.

La mobilisation des TG du tissu adipeux est sous le contrôle de trois enzymes lipolytiques ayant des préférences de substrats différentes : ATGL, HSL et MGL. Quel est le mécanisme moléculaire d'activation de l'ATGL par la protéine CGI-58 ? Afin de mieux comprendre l'interaction de l'ATGL avec la protéine CGI-58, une étude cinétique détaillée d'hydrolyse par l'ATGL seule ou complexée à la protéine CGI-58, de différents lipides pré-étalés à l'interface air/eau devra être effectuée avec le développement de membranes biomimétiques permettant l'analyse fine de séquences réactionnelles de l'ATGL/CGI-58 adsorbés dans un système structural analogue aux membranes biologiques. La visualisation de films monomoléculaires en présence ou en absence de protéine adsorbée à l'interface air/eau pourra se faire grâce à la microscopie à l'angle de Brewster (BAM). Cette technique permet l'observation de films modifiés sous l'action catalytique de l'enzyme directement à l'interface air/eau à l'échelle du micron avec une évaluation de l'épaisseur des monocouches. L'utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (PM-IRRAS ou *Polarization Modulation InfraRed Reflexion Adsorption Spectroscopy*) permettra, quant à elle, d'obtenir de plus amples informations sur la nature et l'organisation conformationnelle et structurale des microdomaines lipidiques formés lors de la catalyse hétérogène impliquant l'ATGL et son partenaire la protéine CGI-58.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## A

- Ahmadian, M., Abbott, M.J., Tang, T., Hudak, C.S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M.K., Lee, H.Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Wang, Y., Duncan, R.E., Kang, C., and Sul, H.S. (2011). Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab* 13, 739-748.
- Akiyama, M., Sakai, K., Takayama, C., Yanagi, T., Yamanaka, Y., McMillan, J.R., and Shimizu, H. (2008). CGI-58 is an alpha/beta-hydrolase within lipid transporting lamellar granules of differentiated keratinocytes. *Am J Pathol* 173, 1349-1360.
- Akiyama, M., Sawamura, D., Nomura, Y., Sugawara, M., and Shimizu, H. (2003). Truncation of CGI-58 protein causes malformation of lamellar granules resulting in ichthyosis in Dorfman-Chanarin syndrome. *J Invest Dermatol* 121, 1029-1034.
- Akoh, C.C., and Min, D.B. (2008). Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology” 3th ed.
- Alberts, B., Johnson, A., and Lewis, J. (2002a). Molecular Biology of the Cell 4th ed.
- Alberts, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002b). Molecular biology of the cell 4th ed.
- Alcazar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., and Tiburcio, A.F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231, 1237-1249.
- Alcazar, R., Bitrian, M., Bartels, D., Koncz, C., Altabella, T., and Tiburcio, A.F. (2011). Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in Arabidopsis and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Signal Behav* 6, 243-250.
- Aloulou, A., Ali, Y.B., Bezzine, S., Gargouri, Y., and Gelb, M.H. (2012). Phospholipases: an overview. *Methods Mol Biol* 861, 63-85.
- Alsted, T.J., Nybo, L., Schweiger, M., Fledelius, C., Jacobsen, P., Zimmermann, R., Zechner, R., and Kiens, B. (2009). Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E445-453.
- Ames, G.F. (1968). Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J Bacteriol* 95, 833-843.
- Anthony, R.G., Henriques, R., Helfer, A., Meszaros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deak, M., Koncz, C., and Bogre, L. (2004). A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis. *EMBO J* 23, 572-581.
- Arnold, K., Kiefer, F., Kopp, J., Battey, J.N., Podvinec, M., Westbrook, J.D., Berman, H.M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2009). The Protein Model Portal. *J Struct Funct Genomics* 10, 1-8.
- Athenstaedt, K., and Daum, G. (2003). YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 23317-23323.
- Athenstaedt, K., and Daum, G. (2005). Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J Biol Chem* 280, 37301-37309.
- Attar, N., and Cullen, P.J. (2010). The retromer complex. *Adv Enzyme Regul* 50, 216-236.

## B

- Bachmann, B.J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* 36, 525-57.
- Baker, A., Graham, I.A., Holdsworth, M., Smith, S.M., and Theodoulou, F.L. (2006). Chewing the fat: beta-oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci* 11, 124-132.

- Banas, W., Sanchez Garcia, A., Banas, A., and Stymne, S. (2013). Activities of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds. *Planta* 237, 1627-1636.
- Banerji, S., and Flieger, A. (2004). Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* 150, 522-525.
- Bartz, R., Zehmer, J.K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y., and Liu, P. (2007). Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res* 6, 3256-3265.
- Bates, P.D., Durrett, T.P., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M. (2009). Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. *Plant Physiol* 150, 55-72.
- Baulande, S., and Langlois, C. (2010). [Proteins sharing PNPLA domain, a new family of enzymes regulating lipid metabolism]. *Med Sci (Paris)* 26, 177-184.
- Baulande, S., Lasnier, F., Lucas, M., and Pairault, J. (2001). Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 276, 33336-33344.
- Bayer, A., Ma, X., Stockigt, J. (2004). Acetyltransfer in natural product biosynthesis--functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg Med Chem* 12, 2787-2795.
- Bell, M., Wang, H., Chen, H., McLenithan, J.C., Gong, D.W., Yang, R.Z., Yu, D., Fried, S.K., Quon, M.J., Londos, C., and Sztalryd, C. (2008). Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes* 57, 2037-2045.
- Ben Ali, Y., Chahinian, H., Petry, S., Muller, G., Carriere, F., Verger, R., and Abousalham, A. (2004). Might the kinetic behavior of hormone-sensitive lipase reflect the absence of the lid domain? *Biochemistry* 43, 9298-9306.
- Ben Selma, Z., Yilmaz, S., Schischmanoff, P.O., Blom, A., Ozogul, C., Laroche, L., and Caux, F. (2007). A novel S115G mutation of CGI-58 in a Turkish patient with Dorfman-Chanarin syndrome. *J Invest Dermatol* 127, 2273-2276.
- Beneyton, T., Coldren, F., Baret, J.C., Griffiths, A.D., and Taly, V. (2014). CotA laccase: high-throughput manipulation and analysis of recombinant enzyme libraries expressed in *E. coli* using droplet-based microfluidics. *Analyst* 139, 3314-3323.
- Bertrand, T., Auge, F., Houtmann, J., Rak, A., Vallee, F., Mikol, V., Berne, P.F., Michot, N., Cheuret, D., Hoornaert, C., and Mathieu, M. (2010). Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition. *J Mol Biol* 396, 663-673.
- Bezaire, V., Mairal, A., Anesia, R., Lefort, C., and Langin, D. (2009a). Chronic TNF $\alpha$  and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS Lett* 583, 3045-3049.
- Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Grousse, A., Jocken, J., Laurencikiene, J., Anesia, R., Rodriguez, A.M., Ryden, M., Stenson, B.M., Dani, C., Ailhaud, G., Arner, P., and Langin, D. (2009b). Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284, 18282-18291.
- Bezzine, S., Ferrato, F., Ivanova, M.G., Lopez, V., Verger, R., and Carriere, F. (1999). Human pancreatic lipase: colipase dependence and interfacial binding of lid domain mutants. *Biochemistry* 38, 5499-5510.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Boeszoermenyi, A., Nagy, H.M., Arthanari, H., Pillip, C.J., Lindermuth, H., Luna, R.E., Wagner, G., Zechner, R., Zangger, K., and Oberer, M. (2015). Structure of a CGI-58 Motif Provides the Molecular Basis of Lipid Droplet Anchoring. *J Biol Chem* 290, 26361-26372.
- Bonaventure, G., Bao, X., Ohlrogge, J., and Pollard, M. (2004). Metabolic responses to the reduction in palmitate caused by disruption of the FATB gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135, 1269-1279.

- Bordes, F., Barbe, S., Escalier, P., Mourey, L., Andre, I., Marty, A., and Tranier, S. (2010). Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophys J* 99, 2225-2234.
- Borg, M.L., Andrews, Z.B., Duh, E.J., Zechner, R., Meikle, P.J., and Watt, M.J. (2011). Pigment epithelium-derived factor regulates lipid metabolism via adipose triglyceride lipase. *Diabetes* 60, 1458-1466.
- Bouvier-Nave, P., Benveniste, P., Noiriél, A., and Schaller, H. (2000a). Expression in yeast of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase cDNA from *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Soc Trans* 28, 692-695.
- Bouvier-Nave, P., Benveniste, P., Oelkers, P., Sturley, S.L., and Schaller, H. (2000b). Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. *Eur J Biochem* 267, 85-96.
- Bozza, P.T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R.A., and Bandeira-Melo, C. (2011). Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85, 205-213.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradley, R.L., Mansfield, J.P., and Maratos-Flier, E. (2005). Neuropeptides, including neuropeptide Y and melanocortins, mediate lipolysis in murine adipocytes. *Obes Res* 13, 653-661.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., and Nørskov, L. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767-770.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hedge, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371, 578-586.
- Brasaemle, D.L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48, 2547-2559.
- Brasaemle, D.L., Barber, T., Kimmel, A.R., and Londos, C. (1997). Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids. *J Biol Chem* 272, 9378-9387.
- Brasaemle, D.L., Levin, D.M., Adler-Wailes, D.C., and Londos, C. (2000a). The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta* 1483, 251-262.
- Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2000b). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 275, 38486-38493.
- Brasaemle, D.L., Subramanian, V., Garcia, A., Marcinkiewicz, A., and Rothenberg, A. (2009). Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cell Biochem* 326, 15-21.
- Bridges, D., Ma, J.T., Park, S., Inoki, K., Weisman, L.S., and Saltiel, A.R. (2012). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate plays a role in the activation and subcellular localization of mechanistic target of rapamycin 1. *Mol Biol Cell* 23, 2955-2962.
- Brown, J.M., Betters, J.L., Lord, C., Ma, Y., Han, X., Yang, K., Alger, H.M., Melchior, J., Sawyer, J., Shah, R., Wilson, M.D., Liu, X., Graham, M.J., Lee, R., Crooke, R., Shulman, G.I., Xue, B., Shi, H., and Yu, L. (2010). CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance. *J Lipid Res* 51, 3306-3315.
- Brown, J.M., Chung, S., Das, A., Shelness, G.S., Rudel, L.L., and Yu, L. (2007). CGI-58 facilitates the mobilization of cytoplasmic triglyceride for lipoprotein secretion in hepatoma cells. *J Lipid Res* 48, 2295-2305.
- Brundiek, H., Sass, S., Evitt, A., Kourist, R., and Bornscheuer, U.T. (2012). The short form of the recombinant CAL-A-type lipase UM03410 from the smut fungus *Ustilago maydis* exhibits an inherent trans-fatty acid selectivity. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 141-150.



Brzozowski, A.M., Savage, H., Verma, C.S., Turkenburg, J.P., Lawson, D.M., Svendsen, A., and Patkar, S. (2000). Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39, 15071-15082.

## C

Cai, Y., Goodman, J.M., Pyc, M., Mullen, R.T., Dyer, J.M., and Chapman, K.D. (2015). Arabidopsis SEIPIN Proteins Modulate Triacylglycerol Accumulation and Influence Lipid Droplet Proliferation. *Plant Cell* 27, 2616-2636.

Capeau, J. (2003). Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance. *Med Sci (Paris)* 19, 834-839.

Carman, G.M., Deems, R.A., and Dennis, E.A. (1995). Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem* 270, 18711-18714.

Carr, P.D., and Ollis, D.L. (2009). Alpha/beta hydrolase fold: an update. *Protein Pept Lett* 16, 1137-1148.

Caviglia, J.M., Sparks, J.D., Toraskar, N., Brinker, A.M., Yin, T.C., Dixon, J.L., and Brasaemle, D.L. (2009). ABHD5/CGI-58 facilitates the assembly and secretion of apolipoprotein B lipoproteins by McA RH7777 rat hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1791, 198-205.

Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S.P., and Welte, M.A. (2006). The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr Biol* 16, 1783-1795.

Chahinian, H., Ali, Y.B., Abousalham, A., Petry, S., Mandrich, L., Manco, G., Canaan, S., and Sarda, L. (2005). Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Biochim Biophys Acta* 1738, 29-36.

Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C.M., and Kandror, K.V. (2010). Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* 59, 775-781.

Chakrabarti, P., and Kandror, K.V. (2009). FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 284, 13296-13300.

Chanarin, I., Patel, A., Slavin, G., Wills, E.J., Andrews, T.M., and Stewart, G. (1975). Neutral-lipid storage disease: a new disorder of lipid metabolism. *Br Med J* 1, 553-555.

Chapman, K.D., Dyer, J.M., and Mullen, R.T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res* 53, 215-226.

Chapman, K.D., and Ohlrogge, J.B. (2012). Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *J Biol Chem* 287, 2288-2294.

Chen, J.F., Dai, L.H., Xu, N.Y., Xiong, Y.Z., and Jiang, S.W. (2006). Assignment of the patatin-like phospholipase domain containing 2 gene (PNPLA2) to porcine chromosome 2p17 with radiation hybrids. *Cytogenet Genome Res* 112, 342G.

Chia, T.Y., Pike, M.J., and Rawsthorne, S. (2005). Storage oil breakdown during embryo development of *Brassica napus* (L.). *J Exp Bot* 56, 1285-1296.

Chung, C., Doll, J.A., Gattu, A.K., Shugrue, C., Cornwell, M., Fitchev, P., and Crawford, S.E. (2008). Anti-angiogenic pigment epithelium-derived factor regulates hepatocyte triglyceride content through adipose triglyceride lipase (ATGL). *J Hepatol* 48, 471-478.

Coleman, J. (1990). Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *J Biol Chem* 265, 17215-17221.

Collins, S., Cao, W., and Robidoux, J. (2004). Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism. *Mol Endocrinol* 18, 2123-2131.

Contreras, J.A., Danielsson, B., Johansson, C., Osterlund, T., Langin, D., and Holm, C. (1998). Human hormone-sensitive lipase: expression and large-scale purification from a baculovirus/insect cell system. *Protein Expr Purif* 12, 93-99.



Cornaciu, I., Boeszoermenyi, A., Lindermuth, H., Nagy, H.M., Cerk, I.K., Ebner, C., Salzburger, B., Gruber, A., Schweiger, M., Zechner, R., Lass, A., Zimmermann, R., and Oberer, M. (2011). The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and G0S2, respectively. *PLoS One* 6, e26349.

Court, D.L., Swaminathan, S., Yu, D., Wilson, H., Baker, T., Bubunenko, M., Sawitzke, J., and Sharan, S.K. (2003). Mini- $\lambda$ : a tractable system for chromosome and BAC engineering. *Gene (Amst.)* 315, 63-69.

Creelman, R.A., and Mulpuri, R. (2002). The oxylipin pathway in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 1, e0012.

Cygler, M., Schrag, J.D., and Ergun, F. (1992). Advances in structural understanding of lipases. *Biotechnol Genet Eng Rev* 10, 143-184.

## D

Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., and Stymne, S. (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6487-6492.

Dalen, K.T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C., and Nebb, H.I. (2007). LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim Biophys Acta* 1771, 210-227.

Das, S.K., Stadelmeyer, E., Schauer, S., Schwarz, A., Strohmaier, H., Claudel, T., Zechner, R., Hoefler, G., and Vesely, P.W. (2015). Micro RNA-124a regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase and comparative gene identification 58. *Int J Mol Sci* 16, 8555-8568.

Dave, A., Hernandez, M.L., He, Z., Andriotis, V.M., Vaistij, F.E., Larson, T.R., and Graham, I.A. (2011). 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 583-599.

De Caterina, R., and Basta, G. (2001). n-3 Fatty acids and the inflammatory response — biological background. *European Heart Journal Supplements* 3, D42-D49.

De Marcos Lousa, C., van Roermund, C.W., Postis, V.L., Dietrich, D., Kerr, I.D., Wanders, R.J., Baldwin, S.A., Baker, A., and Theodoulou, F.L. (2013). Intrinsic acyl-CoA thioesterase activity of a peroxisomal ATP binding cassette transporter is required for transport and metabolism of fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1279-1284.

Deems, R.A., Eaton, B.R., and Dennis, E.A. (1975). Kinetic analysis of phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes. *J Biol Chem* 250, 9013-9020.

Degerman, E., Landstrom, T.R., Wijkander, J., Holst, L.S., Ahmad, F., Belfrage, P., and Manganiello, V. (1998). Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. *Methods* 14, 43-53.

Demerjian, M., Crumrine, D.A., Milstone, L.M., Williams, M.L., and Elias, P.M. (2006). Barrier dysfunction and pathogenesis of neutral lipid storage disease with ichthyosis (Chanarin-Dorfman syndrome). *J Invest Dermatol* 126, 2032-2038.

Dennis, E.A. (1973). Kinetic dependence of phospholipase A2 activity on the detergent Triton X-100. *Journal of lipid research* 14, 152-159.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M.J., and Derewenda, Z.S. (1994). Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng* 7, 551-557.

Derewenda, Z.S., and Cambillau, C. (1991). Effects of gene mutations in lipoprotein and hepatic lipases as interpreted by a molecular model of the pancreatic triglyceride lipase. *The Journal of biological chemistry* 266, 23112-23119.

Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J., and Somers, W.S. (1999). Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 97, 349-360.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10819-10824.

Dorfman, M.L., Hershko, C., Eisenberg, S., and Sagher, F. (1974). Ichthyosiform dermatosis with systemic lipidosis. *Arch Dermatol* *110*, 261-266.

Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids?. *Annu Rev Biochem* *66*, 199-232.

Dryden, S.C., Dowhan, W. (1996). Isolation and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* gene (*pgsA*) encoding phosphatidylglycerophosphate synthase. *J Bacteriol* *178*, 1030-1038.

Ducharme, N.A., and Bickel, P.E. (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* *149*, 942-949.

Duncan, R.E., Wang, Y., Ahmadian, M., Lu, J., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S. (2010). Characterization of desnutrin functional domains: critical residues for triacylglycerol hydrolysis in cultured cells. *J Lipid Res* *51*, 309-317.

## E

Eastmond, P.J. (2004). Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. *J Biol Chem* *279*, 45540-45545.

Eastmond, P.J. (2006). SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* *18*, 665-675.

Eichmann, T.O., Kumari, M., Haas, J.T., Farese, R.V., Jr., Zimmermann, R., Lass, A., and Zechner, R. (2012). Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases. *J Biol Chem* *287*, 41446-41457.

El-Kouhen, K., Blangy, S., Ortiz, E., Gardies, A.M., Ferte, N., and Arondel, V. (2005). Identification and characterization of a triacylglycerol lipase in *Arabidopsis* homologous to mammalian acid lipases. *FEBS Lett* *579*, 6067-6073.

Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.K., Ramezani Rad, M., Rohmer, A., Romer, A., and Hinnen, A. (1999). Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* *262*, 683-702.

Eriksson, H., Ridderstrale, M., Degerman, E., Ekholm, D., Smith, C.J., Manganiello, V.C., Belfrage, P., and Tornqvist, H. (1995). Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin. *Biochim Biophys Acta* *1266*, 101-107.

Ernster, L., and Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et biophysica acta* *1271*, 195-204.

Eydoux, C., Spinelli, S., Davis, T.L., Walker, J.R., Seitova, A., Dhe-Paganon, S., De Caro, A., Cambillau, C., and Carriere, F. (2008). Structure of human pancreatic lipase-related protein 2 with the lid in an open conformation. *Biochemistry* *47*, 9553-9564.

## F

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L., and Dennis, E.A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research* *46*, 839-861.

Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J.O., and Dennis, E.A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research* 50 Suppl, S9-14.

Fan, J., Yan, C., and Xu, C. (2013). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase-mediated triacylglycerol biosynthesis is crucial for protection against fatty acid-induced cell death in growing tissues of Arabidopsis. *Plant J* 76, 930-942.

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942-1945.

Feingold, K.R. (2007). Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res* 48, 2531-2546.

Feingold, K.R. (2009). The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *J Lipid Res* 50 Suppl, S417-422.

Fellenberg, C., Ziegler, J., Handrick, V., and Vogt, T. (2012). Polyamine Homeostasis in Wild Type and Phenolamide Deficient Arabidopsis thaliana Stamens. *Front Plant Sci* 3, 180.

Festuccia, W.T., Laplante, M., Berthiaume, M., Gelinas, Y., and Deshaies, Y. (2006). PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 49, 2427-2436.

Fischer, J., Lefevre, C., Morava, E., Mussini, J.M., Laforet, P., Negre-Salvayre, A., Lathrop, M., and Salvayre, R. (2007a). The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat Genet* 39, 28-30.

Fischer, J., Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (2007b). [Neutral lipid storage diseases and ATGL (adipose triglyceride lipase) and CGI-58/ABHD5 (alpha-beta hydrolase domain-containing 5) deficiency: myopathy, ichthyosis, but no obesity]. *Med Sci (Paris)* 23, 575-578.

Fischer, M., and Pleiss, J. (2003). The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res* 31, 319-321.

Footitt, S., Slocombe, S.P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., and Holdsworth, M. (2002). Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO J* 21, 2912-2922.

Frandsen, G.I., Mundy, J., and Tzen, J.T. (2001). Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol Plant* 112, 301-307.

Franken, S.M., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., and Dijkstra, B.W. (1991). Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *EMBO J* 10, 1297-1302.

Fredrikson, G., Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876, 288-293.

Friedman, J.M. (2000). Obesity in the new millennium. *Nature* 404, 632-634.

Froesch, E.R., Burgi, H., Bally, P., and Labhart, A. (1965). Insulin inhibition of spontaneous adipose tissue lipolysis and effects upon fructose and glucose metabolism. *Mol Pharmacol* 1, 280-296.

Fuchs, C.D., Claudel, T., Kumari, P., Haemmerle, G., Pollheimer, M.J., Stojakovic, T., Scharnagl, H., Halilbasic, E., Gumhold, J., Silbert, D., Koefeler, H., and Trauner, M. (2012). Absence of adipose triglyceride lipase protects from hepatic endoplasmic reticulum stress in mice. *Hepatology* 56, 270-280.

Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.

## G

Galloway, S.M., and Raetz, C.R. (1990). A mutant of Escherichia coli defective in the first step of endotoxin biosynthesis. *J Biol Chem* 265, 6394-6402.

- Gao, X.-G., Cao, S.-G., and Zhang, K.-C. (1997). The Influence of Different Physicochemical Parameters of the Solvent On The Activity and Selectivity of Lipase. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica* 29, 337-342.
- Ghosh, A.K., Chauhan, N., Rajakumari, S., Daum, G., and Rajasekharan, R. (2009). At4g24160, a soluble acyl-coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Plant Physiol* 151, 869-881.
- Ghosh, A.K., Ramakrishnan, G., Chandramohan, C., and Rajasekharan, R. (2008a). CGI-58, the causative gene for Chanarin-Dorfman syndrome, mediates acylation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 283, 24525-24533.
- Ghosh, A.K., Ramakrishnan, G., and Rajasekharan, R. (2008b). YLR099C (ICT1) encodes a soluble Acyl-CoA-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic solvent stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283, 9768-9775.
- Gibbons, G.F., Islam, K., and Pease, R.J. (2000). Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochimica et biophysica acta* 1483, 37-57.
- Golczak, M., Kiser, P.D., Sears, A.E., Lodowski, D.T., Blaner, W.S., and Palczewski, K. (2012). Structural basis for the acyltransferase activity of lecithin:retinol acyltransferase-like proteins. *J Biol Chem* 287, 23790-23807.
- Gollnick, P.D., and King, D.W. (1969). Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 216, 1502-1509.
- Goodman, J.M. (2008). The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem* 283, 28005-28009.
- Goodridge, A.G., and Ball, E.G. (1965). Studies on the metabolism of adipose tissue. 18. In vitro effects of insulin, epinephrine and glucagon on lipolysis and glycolysis in pigeon adipose tissue. *Comp Biochem Physiol* 16, 367-381.
- Graham, I.A. (2008). Seed storage oil mobilization. *Annual review of plant biology* 59, 115-142.
- Granneman, J.G., and Moore, H.P. (2008). Location, location: protein trafficking and lipolysis in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* 19, 3-9.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Granneman, R.L., Greenberg, A.S., Obin, M.S., and Zhu, Z. (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* 282, 5726-5735.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Krishnamoorthy, R., and Rathod, M. (2009a). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* 284, 34538-34544.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Mottillo, E.P., and Zhu, Z. (2009b). Functional interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 284, 3049-3057.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Mottillo, E.P., Zhu, Z., and Zhou, L. (2011). Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* 286, 5126-5135.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., and Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266, 11341-11346.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Moos, M.C., Jr., Londos, C., and Kimmel, A.R. (1993). Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 12035-12039.
- Gregory, E.L. (1989). Thermoregulatory aspects of adipose tissue. *Clin Dermatol* 7, 78-92.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., and Cygler, M. (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* 268, 12843-12847.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., and Cygler, M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci* 3, 82-91.

Gronke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Muller, G., Jackle, H., and Kuhnlein, R.P. (2005). Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab* 1, 323-330.

Gruber, A., Cornaciu, I., Lass, A., Schweiger, M., Poeschl, M., Eder, C., Kumari, M., Schoiswohl, G., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., Zechner, R., Zimmermann, R., and Oberer, M. (2010). The N-terminal region of comparative gene identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* 285, 12289-12298.

## H

Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E.F., Klingenspor, M., Hoefler, G., and Zechner, R. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737.

Haemmerle, G., Moustafa, T., Woelkart, G., Buttner, S., Schmidt, A., van de Weijer, T., Hesselink, M., Jaeger, D., Kienesberger, P.C., Zierler, K., Schreiber, R., Eichmann, T., Kolb, D., Kotzbeck, P., Schweiger, M., Kumari, M., Eder, S., Schoiswohl, G., Wongsiriroj, N., Pollak, N.M., Radner, F.P., Preiss-Landl, K., Kolbe, T., Rulicke, T., Pieske, B., Trauner, M., Lass, A., Zimmermann, R., Hoefler, G., Cinti, S., Kershaw, E.E., Schrauwen, P., Madeo, F., Mayer, B., and Zechner, R. (2011). ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. *Nat Med* 17, 1076-1085.

Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T.M., Wagner, E.F., and Zechner, R. (2002a). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277, 4806-4815.

Haemmerle, G., Zimmermann, R., Strauss, J.G., Kratky, D., Riederer, M., Knipping, G., and Zechner, R. (2002b). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice changes the plasma lipid profile by affecting the tissue-specific expression pattern of lipoprotein lipase in adipose tissue and muscle. *J Biol Chem* 277, 12946-12952.

Haiker, H., Lengsfeld, H., Hadvary, P., and Carriere, F. (2004). Rapid exchange of pancreatic lipase between triacylglycerol droplets. *Biochimica et biophysica acta* 1682, 72-79.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 139-150.

Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T., and Nishimura, M. (2002). Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell Physiol* 43, 1-11.

Hayashi, Y., Hayashi, M., Hayashi, H., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2001). Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana* ped1 mutant. *Protoplasma* 218, 83-94.

He, S., McPhaul, C., Li, J.Z., Garuti, R., Kinch, L., Grishin, N.V., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2010). A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285, 6706-6715.

Heath, R.J., and Rock, C.O. (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol* 180, 1425-1430.

Henry, S.A., Kohlwein, S.D., and Carman, G.M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 317-349.

Hermansson, M., Hokynar, K., and Somerharju, P. (2011). Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Prog Lipid Res* 50, 240-257.

Hewezi, T., Howe, P.J., Maier, T.R., Hussey, R.S., Mitchum, M.G., Davis, E.L., and Baum, T.J. (2010). *Arabidopsis* spermidine synthase is targeted by an effector protein of the cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Plant Physiol* 152, 968-984.

Hills, M.J., and Beevers, H. (1987). Ca stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. *Plant Physiol* 84, 272-276.



- Hills, M.J., and Murphy, D.J. (1988). Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucic acid-free oilseed-rape (*Brassica napus*) cotyledons. *Biochem J* 249, 687-693.
- Hills, M.J., Murphy, D.J., and Beevers, H. (1989). Inhibition of Neutral Lipase from Castor Bean Lipid Bodies by Coenzyme A (CoA) and Oleoyl-CoA. *Plant Physiol* 89, 1006-1010.
- Hirano, K., Ikeda, Y., Zaima, N., Sakata, Y., and Matsumiya, G. (2008). Triglyceride deposit cardiomyovascuopathy. *N Engl J Med* 359, 2396-2398.
- Hodges, B.D., and Wu, C.C. (2010). Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J Lipid Res* 51, 262-273.
- Hollenberg, C.H., Raben, M.S., and Astwood, E.B. (1961). The lipolytic response to corticotropin. *Endocrinology* 68, 589-598.
- Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31, 1120-1124.
- Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B., and Belfrage, P. (1987). Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Bioscience reports* 7, 897-904.
- Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H., and Contreras, J.A. (2000). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr* 20, 365-393.
- Holthuis, J.C., and Menon, A.K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510, 48-57.
- Hoppeler, H., and Fluck, M. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* 35, 95-104.
- Hornberger, T.A., Chu, W.K., Mak, Y.W., Hsiung, J.W., Huang, S.A., and Chien, S. (2006). The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4741-4746.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, NY)* 259, 87-91.
- Hoy, A.J., Bruce, C.R., Turpin, S.M., Morris, A.J., Febbraio, M.A., and Watt, M.J. (2011). Adipose triglyceride lipase-null mice are resistant to high-fat diet-induced insulin resistance despite reduced energy expenditure and ectopic lipid accumulation. *Endocrinology* 152, 48-58.
- Huang, N.L., Huang, M.D., Chen, T.L., and Huang, A.H. (2013). Oleosin of subcellular lipid droplets evolved in green algae. *Plant Physiol* 161, 1862-1874.
- Huang, S., Gao, L., Blanchoin, L., and Staiger, C.J. (2006). Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is regulated by phosphatidic acid. *Mol Biol Cell* 17, 1946-1958.
- Huang, Y., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2011). Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 286, 37085-37093.
- Huijsman, E., van de Par, C., Economou, C., van der Poel, C., Lynch, G.S., Schoiswohl, G., Haemmerle, G., Zechner, R., and Watt, M.J. (2009). Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E505-513.

## I

- Igal, R.A., Rhoads, J.M., and Coleman, R.A. (1997). Neutral lipid storage disease with fatty liver and cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 25, 541-547.
- Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y., and Takahashi, T. (2004). Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135, 1565-1573.



Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHIER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* *13*, 2191-2209.

## J

Jacks, T.J., Yatsu, L.Y., and Altschul, A.M. (1967). Isolation and characterization of peanut spherosomes. *Plant physiology* *42*, 585-597.

Jaillais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miege, C., and Gaude, T. (2007). The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* *130*, 1057-1070.

Jain, M.K., Gelb, M.H., Rogers, J., and Berg, O.G. (1995). Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A2. *Methods Enzymol* *249*, 567-614.

James, C.N., Horn, P.J., Case, C.R., Gidda, S.K., Zhang, D., Mullen, R.T., Dyer, J.M., Anderson, R.G., and Chapman, K.D. (2010). Disruption of the Arabidopsis CGI-58 homologue produces Chananin-Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 17833-17838.

Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., and Gross, R.W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* *279*, 48968-48975.

Jenkins, R.W., Canals, D., and Hannun, Y.A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal* *21*, 836-846.

Jennens, M.L., and Lowe, M.E. (1994). A surface loop covering the active site of human pancreatic lipase influences interfacial activation and lipid binding. *J Biol Chem* *269*, 25470-25474.

Jensen, J.M., and Proksch, E. (2009). The skin's barrier. *G Ital Dermatol Venereol* *144*, 689-700.

Jensen, R.G., deJong, F.A., and Clark, R.M. (1983). Determination of lipase specificity. *Lipids* *18*, 239-252.

Jocken, J.W., Langin, D., Smit, E., Saris, W.H., Valle, C., Hul, G.B., Holm, C., Arner, P., and Blaak, E.E. (2007). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* *92*, 2292-2299.

Jolivet, P., Acevedo, F., Boulard, C., d'Andrea, S., Faure, J.D., Kohli, A., Nesi, N., Valot, B., and Chardot, T. (2013). Crop seed oil bodies: from challenges in protein identification to an emerging picture of the oil body proteome. *Proteomics* *13*, 1836-1849.

Jolivet, P., Roux, E., D'Andrea, S., Davanture, M., Negroni, L., Zivy, M., and Chardot, T. (2004). Protein composition of oil bodies in Arabidopsis thaliana ecotype WS. *Plant Physiol Biochem* *42*, 501-509.

## K

Karlsson, M., Contreras, J.A., Hellman, U., Tornqvist, H., and Holm, C. (1997). cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem* *272*, 27218-27223.

Katavic, V., Reed, D.W., Taylor, D.C., Giblin, E.M., Barton, D.L., Zou, J., Mackenzie, S.L., Covello, P.S., and Kunst, L. (1995). Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in Arabidopsis thaliana affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol* *108*, 399-409.

Kelley, L.A., and Sternberg, M.J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* *4*, 363-371.

Kelly, A.A., Quettier, A.L., Shaw, E., and Eastmond, P.J. (2011). Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis. *Plant Physiol* *157*, 866-875.

- Kelly, A.A., van Erp, H., Quettier, A.L., Shaw, E., Menard, G., Kurup, S., and Eastmond, P.J. (2013). The sugar-dependent1 lipase limits triacylglycerol accumulation in vegetative tissues of Arabidopsis. *Plant Physiol* 162, 1282-1289.
- Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J.S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55, 148-157.
- Kershaw, E.E., Schupp, M., Guan, H.P., Gardner, N.P., Lazar, M.A., and Flier, J.S. (2007). PPARgamma regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1736-1745.
- Khan, M.I., Iqbal, N., Masood, A., Per, T.S., and Khan, N.A. (2013). Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signal Behav* 8, e26374.
- Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 37, D387-392.
- Kienesberger, P.C., Oberer, M., Lass, A., and Zechner, R. (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 50 Suppl, S63-68.
- Kim, J.Y., Tillison, K., Lee, J.H., Rearick, D.A., and Smas, C.M. (2006). The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E115-127.
- Knott, T.J., Pease, R.J., Powell, L.M., Wallis, S.C., Rall, S.C., Jr., Innerarity, T.L., Blackhart, B., Taylor, W.H., Marcel, Y., and Milne, R. (1986). Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 323, 734-738.
- Kobayashi, K., Inoguchi, T., Maeda, Y., Nakashima, N., Kuwano, A., Eto, E., Ueno, N., Sasaki, S., Sawada, F., Fujii, M., Matoba, Y., Sumiyoshi, S., Kawate, H., and Takayanagi, R. (2008). The lack of the C-terminal domain of adipose triglyceride lipase causes neutral lipid storage disease through impaired interactions with lipid droplets. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 2877-2884.
- Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., and Fasshauer, M. (2005). Isoproterenol, TNFalpha, and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 240, 43-49.
- Krintel, C., Osmark, P., Larsen, M.R., Resjo, S., Logan, D.T., and Holm, C. (2008). Ser649 and Ser650 are the major determinants of protein kinase A-mediated activation of human hormone-sensitive lipase against lipid substrates. *PLoS One* 3, e3756.
- Kumari, M., Schoiswohl, G., Chitraju, C., Paar, M., Cornaciu, I., Rangrez, A.Y., Wongsiriroj, N., Nagy, H.M., Ivanova, P.T., Scott, S.A., Knittelfelder, O., Rechberger, G.N., Birner-Gruenberger, R., Eder, S., Brown, H.A., Haemmerle, G., Oberer, M., Lass, A., Kershaw, E.E., Zimmermann, R., and Zechner, R. (2012). Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab* 15, 691-702.
- Kunz, H.H., Scharnewski, M., Feussner, K., Feussner, I., Flugge, U.I., Fulda, M., and Gierth, M. (2009). The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of Arabidopsis during extended darkness. *Plant Cell* 21, 2733-2749.
- Kuramoto, K., Okamura, T., Yamaguchi, T., Nakamura, T.Y., Wakabayashi, S., Morinaga, H., Nomura, M., Yanase, T., Otsu, K., Usuda, N., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., Kojima, Y., Hashimoto, T., Sakai, F., Hirose, F., and Osumi, T. (2012). Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *J Biol Chem* 287, 23852-23863.
- Kurat, C.F., Natter, K., Petschnigg, J., Wolinski, H., Scheuringer, K., Scholz, H., Zimmermann, R., Leber, R., Zechner, R., and Kohlwein, S.D. (2006). Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *J Biol Chem* 281, 491-500.

Kurat, C.F., Wolinski, H., Petschnigg, J., Kaluarachchi, S., Andrews, B., Natter, K., and Kohlwein, S.D. (2009). Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Mol Cell* 33, 53-63.

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., and Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228, 367-381.

## L

Labar, G., Bauvois, C., Borel, F., Ferrer, J.L., Wouters, J., and Lambert, D.M. (2010). Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *Chembiochem* 11, 218-227.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lafontan, M., and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Journal of lipid research* 34, 1057-1091.

Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48, 275-297.

Lai, C.H., Chou, C.Y., Ch'ang, L.Y., Liu, C.S., and Lin, W. (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* 10, 703-713.

Lake, A.C., Sun, Y., Li, J.L., Kim, J.E., Johnson, J.W., Li, D., Revett, T., Shih, H.H., Liu, W., Paulsen, J.E., and Gimeno, R.E. (2005). Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res* 46, 2477-2487.

Langin, D. (2006). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 53, 482-491.

Larrouy, D., Galitzky, J., and Lafontan, M. (1991). A1 adenosine receptors in the human fat cell: tissue distribution and regulation of radioligand binding. *Eur J Pharmacol* 206, 139-147.

Larsson, A., and Erlanson-Albertsson, C. (1991). The effect of pancreatic procolipase and colipase on pancreatic lipase activation. *Biochim Biophys Acta* 1083, 283-288.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3, 309-319.

Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., and Zechner, R. (2011). Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 50, 14-27.

Laurell, H., Contreras, J.A., Castan, I., Langin, D., and Holm, C. (2000). Analysis of the psychrotolerant property of hormone-sensitive lipase through site-directed mutagenesis. *Protein engineering* 13, 711-717.

Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Rety, S., Verma, C., and Dodson, G.G. (1994). Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Eng* 7, 543-550.

Lefevre, C., Jobard, F., Caux, F., Bouadjar, B., Karaduman, A., Heilig, R., Lakhdar, H., Wollenberg, A., Verret, J.L., Weissenbach, J., Ozguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J.F., and Fischer, J. (2001). Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet* 69, 1002-1012.

Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T.P., Franke, R.B., Graham, I.A., Katayama, K., Kelly, A.A., Larson, T., Markham, J.E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K.M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., and Ohlrogge, J. (2013). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* 11, e0161.

- Li, J.Z., Huang, Y., Karaman, R., Ivanova, P.T., Brown, H.A., Roddy, T., Castro-Perez, J., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2012). Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J Clin Invest* 122, 4130-4144.
- Liao, D.I., and Remington, S.J. (1990). Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. *J Biol Chem* 265, 6528-6531.
- Lichtenberg, D., Robson, R.J., and Dennis, E.A. (1983). Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochimica et biophysica acta* 737, 285-304.
- Lin, L.J., Liao, P.C., Yang, H.H., and Tzen, J.T. (2005). Determination and analyses of the N-termini of oil-body proteins, steroleosin, caleosin and oleosin. *Plant Physiol Biochem* 43, 770-776.
- Lin, Y.H., and Huang, A.H. (1983). Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Arch Biochem Biophys* 225, 360-369.
- Lin, Y.H., and Huang, A.H. (1984). Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings. *Plant Physiol* 76, 719-722.
- Listenberger, L.L., Ostermeyer-Fay, A.G., Goldberg, E.B., Brown, W.J., and Brown, D.A. (2007). Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res* 48, 2751-2761.
- Liu, L.F., Purushotham, A., Wendel, A.A., Koba, K., DeLuliis, J., Lee, K., and Belury, M.A. (2009). Regulation of adipose triglyceride lipase by rosiglitazone. *Diabetes Obes Metab* 11, 131-142.
- Londos, C., Brasaemle, D.L., Schultz, C.J., Segrest, J.P., and Kimmel, A.R. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 10, 51-58.
- Lord, C.C., Betters, J.L., Ivanova, P.T., Milne, S.B., Myers, D.S., Madenspacher, J., Thomas, G., Chung, S., Liu, M., Davis, M.A., Lee, R.G., Croke, R.M., Graham, M.J., Parks, J.S., Brasaemle, D.L., Fessler, M.B., Brown, H.A., and Brown, J.M. (2012). CGI-58/ABHD5-derived signaling lipids regulate systemic inflammation and insulin action. *Diabetes* 61, 355-363.
- Lu, C., and Hills, M.J. (2002). Arabidopsis mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development. *Plant Physiol* 129, 1352-1358.
- Lu, X., Yang, X., and Liu, J. (2010). Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2. *Cell Cycle* 9, 2719-2725.
- Lu, Y.H., Guan, Z., Zhao, J., Raetz, C.R. (2011). Three phosphatidylglycerol-phosphate phosphatases in the inner membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem* 286, 5506-5518.
- Lynes, E.M., and Simmen, T. (2011). Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1893-1905.

## M

- Machy, P., Truneh, A., Gennaro, D., and Hoffstein, S. (1987). Endocytosis and de novo expression of major histocompatibility complex encoded class I molecules: kinetic and ultrastructural studies. *European journal of cell biology* 45, 126-136.
- Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121, 231-241.
- Maeshima, M., and Beevers, H. (1985). Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean. *Plant Physiol* 79, 489-493.
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Jr., and Amundson, C.H. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 14, 426-446.

- Martinelle, M., Holmquist, M., Clausen, I.G., Patkar, S., Svendsen, A., and Hult, K. (1996). The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase. *Protein Eng* 9, 519-524.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J.B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B.H., Quast, M.J., Gorenstein, D., Chen, K.H., and Chan, L. (2000). Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet* 26, 474-479.
- Masood, A., Iqbal, N., and Khan, N.A. (2012). Role of ethylene in alleviation of cadmium-induced photosynthetic capacity inhibition by sulphur in mustard. *Plant Cell Environ* 35, 524-533.
- Matsui, K., Fukutomi, S., Ishii, M., and Kajiwar, T. (2004). A tomato lipase homologous to DAD1 (*LeLID1*) is induced in post-germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase. *FEBS Lett* 569, 195-200.
- Matsui, K., Hirayama, T., Kuroda, K., Shirahige, K., Ashikari, T., and Ueda, M. (2006). Screening for candidate genes involved in tolerance to organic solvents in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 75-79.
- Mayinger, P. (2012). Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1821, 1104-1113.
- McMahon, D., Dinh, A., Kurz, D., Shah, D., Han, G.S., Carman, G.M., and Brasaemle, D.L. (2014). Comparative gene identification 58/alpha/beta hydrolase domain 5 lacks lysophosphatidic acid acyltransferase activity. *J Lipid Res* 55, 1750-1761.
- Menzaghi, C., Ercolino, T., Di Paola, R., Berg, A.H., Warram, J.H., Scherer, P.E., Trischitta, V., and Doria, A. (2002). A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51, 2306-2312.
- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J., and Wang, X. (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* 312, 264-266.
- Missaglia, S., Valadares, E.R., Moro, L., Fagundes, E.D., Quintao Roque, R., Giardina, B., and Tavian, D. (2014). Early onset of Chananin-Dorfman syndrome with severe liver involvement in a patient with a complex rearrangement of ABHD5 promoter. *BMC Med Genet* 15, 32.
- Miyoshi, H., Perfield, J.W., 2nd, Souza, S.C., Shen, W.J., Zhang, H.H., Stancheva, Z.S., Kraemer, F.B., Obin, M.S., and Greenberg, A.S. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 282, 996-1002.
- Montero-Moran, G., Caviglia, J.M., McMahon, D., Rothenberg, A., Subramanian, V., Xu, Z., Lara-Gonzalez, S., Storch, J., Carman, G.M., and Brasaemle, D.L. (2010). CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *J Lipid Res* 51, 709-719.
- Mottillo, E.P., Bloch, A.E., Leff, T., and Granneman, J.G. (2012). Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem* 287, 25038-25048.
- Mulder, H., Sorhede-Winzell, M., Contreras, J.A., Fex, M., Strom, K., Ploug, T., Galbo, H., Arner, P., Lundberg, C., Sundler, F., Ahren, B., and Holm, C. (2003). Hormone-sensitive lipase null mice exhibit signs of impaired insulin sensitivity whereas insulin secretion is intact. *J Biol Chem* 278, 36380-36388.
- Murata, N., and Tasaka, Y. (1997). Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochim Biophys Acta* 1348, 10-16.
- Murphy, D.J. (1993). Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progress in lipid research* 32, 247-280.
- Murphy, D.J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in lipid research* 40, 325-438.
- Murphy, D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249, 541-585.



Murphy, D.J., and Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in biochemical sciences* 24, 109-115.

Murphy, S., Martin, S., and Parton, R.G. (2009). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* 1791, 441-447.

## N

Nagy, H.M., Paar, M., Heier, C., Moustafa, T., Hofer, P., Haemmerle, G., Lass, A., Zechner, R., Oberer, M., and Zimmermann, R. (2014). Adipose triglyceride lipase activity is inhibited by long-chain acyl-coenzyme A. *Biochim Biophys Acta* 1841, 588-594.

Narbonne, P., and Roy, R. (2009). *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature* 457, 210-214.

Nardini, M., and Dijkstra, B.W. (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9, 732-737.

Ncube, I., Gitlesen, T., Adlercreutz, P., Read, J.S., and Mattiasson, B. (1995). Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed. *Biochim Biophys Acta* 1257, 149-156.

Nicholls, D.G., and Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological reviews* 64, 1-64.

Nicholls, D.G., and Rial, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr* 31, 399-406.

Nishijima, M., Bulawa, C.E., and Raetz, C.R. (1981). Two interacting mutations causing temperature-sensitive phosphatidylglycerol synthesis in *Escherichia coli* membranes. *J Bacteriol* 145, 113-121.

Noble, M.E., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R., and Frenken, L.G. (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* 331, 123-128.

Noble, M.E., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R., and Frenken, L.G. (1994). Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase. *Protein Eng* 7, 559-562.

Nohturfft, A., and Zhang, S.C. (2009). Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 539-566.

Notari, L., Baladron, V., Aroca-Aguilar, J.D., Balko, N., Heredia, R., Meyer, C., Notario, P.M., Saravanamuthu, S., Nueda, M.L., Sanchez-Sanchez, F., Escribano, J., Laborda, J., and Becerra, S.P. (2006). Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 281, 38022-38037.

Nunes, P.M., van de Weijer, T., Veltien, A., Arnts, H., Hesselink, M.K., Glatz, J.F., Schrauwen, P., Tack, C.J., and Heerschap, A. (2012). Increased intramyocellular lipids but unaltered in vivo mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of adipose triglyceride lipase-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E71-81.

## O

Oberer, M., Boeszoermenyi, A., Nagy, H.M., and Zechner, R. (2011). Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58. *Curr Opin Lipidol* 22, 149-158.

Offermanns, S. (2006). The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci* 27, 384-390.

Ohlrogge, J., and Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957-970.

Okazaki, H., Osuga, J., Tamura, Y., Yahagi, N., Tomita, S., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Kimura, S., Gotoda, T., Shimano, H., Yamada, N., and Ishibashi, S. (2002). Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. *Diabetes* 51, 3368-3375.



Oliviussun, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y.C., Jiang, L., and Robinson, D.G. (2006). Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in Arabidopsis, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell* 18, 1239-1252.

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., and Schrag, J. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5, 197-211.

Ong, K.T., Mashek, M.T., Bu, S.Y., Greenberg, A.S., and Mashek, D.G. (2011). Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology* 53, 116-126.

Ong, K.T., Mashek, M.T., Bu, S.Y., and Mashek, D.G. (2013). Hepatic ATGL knockdown uncouples glucose intolerance from liver TAG accumulation. *FASEB J* 27, 313-321.

Osterlund, T. (2001). Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase. *Eur J Biochem* 268, 1899-1907.

Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F.B., Tsutsumi, O., and Yamada, N. (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 787-792.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.

## P

Panaiotov, I., Ivanova, M., and Verger, R. (1997). Interfacial and temporal organization of enzymatic lipolysis. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2, 517-525.

Park, J., Gu, Y., Lee, Y., and Yang, Z. (2004). Phosphatidic acid induces leaf cell death in Arabidopsis by activating the Rho-related small G protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation. *Plant Physiol* 134, 129-136.

Park, S., Gidda, S.K., James, C.N., Horn, P.J., Khoo, N., Seay, D.C., Keereetaweep, J., Chapman, K.D., Mullen, R.T., and Dyer, J.M. (2013). The alpha/beta hydrolase CGI-58 and peroxisomal transport protein PXA1 coregulate lipid homeostasis and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 1726-1739.

Park, S., Keereetaweep, J., James, C.N., Gidda, S.K., Chapman, K.D., Mullen, R.T., and Dyer, J.M. (2014). CGI-58, a key regulator of lipid homeostasis and signaling in plants, also regulates polyamine metabolism. *Plant Signal Behav* 9, e27723.

Park, S.H., and Blackstone, C. (2010). Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep* 11, 515-521.

Pathak, D., Ngai, K.L., and Ollis, D. (1988). X-ray crystallographic structure of dienelactone hydrolase at 2.8 Å. *J Mol Biol* 204, 435-445.

Phillips, R.M., Six, D.A., Dennis, E.A., and Ghosh, P. (2003). In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 278, 41326-41332.

Pinent, M., Hackl, H., Burkard, T.R., Prokesch, A., Papak, C., Scheideler, M., Hammerle, G., Zechner, R., Trajanoski, Z., and Strauss, J.G. (2008). Differential transcriptional modulation of biological processes in adipocyte triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Genomics* 92, 26-32.

Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C., and Schmid, R.D. (2000). Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, 491-508.

Pleiss, J., Fischer, M., and Schmid, R.D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids* 93, 67-80.

Pourcher, M., Santambrogio, M., Thazar, N., Thierry, A.M., Fobis-Loisy, I., Miege, C., Jaillais, Y., and Gaude, T. (2010). Analyses of sorting nexins reveal distinct retromer-subcomplex functions in development and protein sorting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22, 3980-3991.

Poxleitner, M., Rogers, S.W., Lacey Samuels, A., Browse, J., and Rogers, J.C. (2006). A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination. *Plant J* 47, 917-933.

Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063-1072.

## Q

Quettier, A.L., Shaw, E., and Eastmond, P.J. (2008). SUGAR-DEPENDENT6 encodes a mitochondrial flavin adenine dinucleotide-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, which is required for glycerol catabolism and post germinative seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148, 519-528.

Quiroga, A.D., and Lehner, R. (2012). Liver triacylglycerol lipases. *Biochim Biophys Acta* 1821, 762-769.

## R

Radner, F.P., Grond, S., Haemmerle, G., Lass, A., and Zechner, R. (2011). Fat in the skin: Triacylglycerol metabolism in keratinocytes and its role in the development of neutral lipid storage disease. *Dermatoendocrinol* 3, 77-83.

Radner, F.P., Streith, I.E., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kumari, M., Eichmann, T.O., Rechberger, G., Koefeler, H.C., Eder, S., Schauer, S., Theussl, H.C., Preiss-Landl, K., Lass, A., Zimmermann, R., Hoefler, G., Zechner, R., and Haemmerle, G. (2010). Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58). *J Biol Chem* 285, 7300-7311.

Rajakumari, S., and Daum, G. (2010). Janus-faced enzymes yeast Tgl3p and Tgl5p catalyze lipase and acyltransferase reactions. *Mol Biol Cell* 21, 501-510.

Richelsen, B. (1992). Release and effects of prostaglandins in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 47, 171-182.

Rizack, M.A. (1964). Activation of an Epinephrine-Sensitive Lipolytic Activity from Adipose Tissue by Adenosine 3',5'-Phosphate. *J Biol Chem* 239, 392-395.

Rodbell, M., and Jones, A.B. (1966). Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem* 241, 140-142.

Rodriguez, J.A., Ben Ali, Y., Abdelkafi, S., Mendoza, L.D., Leclaire, J., Fotiadu, F., Buono, G., Carriere, F., and Abousalham, A. (2010). In vitro stereoselective hydrolysis of diacylglycerols by hormone-sensitive lipase. *Biochim Biophys Acta* 1801, 77-83.

Rodriguez, J.A., Mendoza, L.D., Pezzotti, F., Vanthuyne, N., Leclaire, J., Verger, R., Buono, G., Carriere, F., and Fotiadu, F. (2008). Novel chromatographic resolution of chiral diacylglycerols and analysis of the stereoselective hydrolysis of triacylglycerols by lipases. *Analytical biochemistry* 375, 196-208.

Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., and Verger, R. (1993a). Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality* 5, 24-30.

Rogalska, E., Ransac, S., and Verger, R. (1993b). Controlling lipase stereoselectivity via the surface pressure. *The Journal of biological chemistry* 268, 792-794.

Roussel, A., Miled, N., Berti-Dupuis, L., Riviere, M., Spinelli, S., Berna, P., Gruber, V., Verger, R., and Cambillau, C. (2002). Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. *J Biol Chem* 277, 2266-2274.

Routaboul, J.M., Benning, C., Bechtold, N., Caboche, M., and Lepiniec, L. (1999). The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol Biochem* 37, 831-840.

Rowe, G.C., El-Khoury, R., Patten, I.S., Rustin, P., and Arany, Z. (2012). PGC-1 $\alpha$  is dispensable for exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *PLoS One* 7, e41817.

Russell, L., and Forsdyke, D.R. (1991). A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated. *DNA Cell Biol* 10, 581-591.

Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., Pershing, J.C., Purcell, J.P., and Alibhai, M.F. (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 42, 6696-6708.

## S

Saarela, J., Jung, G., Hermann, M., Nimpf, J., and Schneider, W.J. (2008). The patatin-like lipase family in *Gallus gallus*. *BMC Genomics* 9, 281.

Saha, S., Enugutti, B., Rajakumari, S., and Rajasekharan, R. (2006). Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol* 141, 1533-1543.

Sahu-Osen, A., Montero-Moran, G., Schittmayer, M., Fritz, K., Dinh, A., Chang, Y.F., McMahon, D., Boeszoermenyi, A., Cornaciu, I., Russell, D., Oberer, M., Carman, G.M., Birner-Gruenberger, R., and Brasaemle, D.L. (2015). CGI-58/ABHD5 is phosphorylated on Ser239 by protein kinase A: control of subcellular localization. *J Lipid Res* 56, 109-121.

Saka, H.A., and Valdivia, R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 411-437.

Sandhoff, R. (2010). Very long chain sphingolipids: tissue expression, function and synthesis. *FEBS Lett* 584, 1907-1913.

Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* 22, 2959-2969.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 270, 26746-26749.

Schoiswohl, G., Schweiger, M., Schreiber, R., Gorkiewicz, G., Preiss-Landl, K., Taschler, U., Zierler, K.A., Radner, F.P., Eichmann, T.O., Kienesberger, P.C., Eder, S., Lass, A., Haemmerle, G., Alsted, T.J., Kiens, B., Hoefler, G., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2010). Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fatty acids. *J Lipid Res* 51, 490-499.

Schrag, J.D., and Cygler, M. (1997). Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol* 284, 85-107.

Schrag, J.D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H.J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T.J., Oliver, J.D., Strickland, L.C., Dunaway, C.M., Larson, S.B., Day, J., and McPherson, A. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* 5, 187-202.

Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S., and Cygler, M. (1991). Multiple crystal forms of lipases from *Geotrichum candidum*. *J Mol Biol* 220, 541-543.

Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, T., and Chory, J. (1999). The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev* 13, 3259-3270.

Schweiger, M., Lass, A., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., and Zechner, R. (2009). Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E289-296.

- Schweiger, M., Schoiswohl, G., Lass, A., Radner, F.P., Haemmerle, G., Malli, R., Graier, W., Cornaciu, I., Oberer, M., Salvayre, R., Fischer, J., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2008). The C-terminal region of human adipose triglyceride lipase affects enzyme activity and lipid droplet binding. *J Biol Chem* 283, 17211-17220.
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* 281, 40236-40241.
- Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278, 48617-48626.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4788-4793.
- Serr, J., Suh, Y., and Lee, K. (2011). Cloning of comparative gene identification-58 gene in avian species and investigation of its developmental and nutritional regulation in chicken adipose tissue. *J Anim Sci* 89, 3490-3500.
- Servetnick, D.A., Brasaemle, D.L., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., Wolff, J., and Londos, C. (1995). Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem* 270, 16970-16973.
- Shan, T., Wang, Y., Wu, T., Guo, J., Liu, J., Feng, J., and Xu, Z. (2008). Porcine adipose triglyceride lipase complementary deoxyribonucleic acid clone, expression pattern, and regulation by resveratrol. *J Anim Sci* 86, 1781-1788.
- Shekar, S., Tumaney, A.W., Rao, T.J., and Rajasekharan, R. (2002). Isolation of lysophosphatidic acid phosphatase from developing peanut cotyledons. *Plant Physiol* 128, 988-996.
- Shewry, P.R. (2003). Tuber storage proteins. *Ann Bot* 91, 755-769.
- Shimada, T., Koumoto, Y., Li, L., Yamazaki, M., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2006). AtVPS29, a putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage proteins. *Plant Cell Physiol* 47, 1187-1194.
- Siloto, R.M., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E.C., Nykiforuk, C.L., and Moloney, M.M. (2006). The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1961-1974.
- Slocombe, S.P., Cornah, J., Pinfield-Wells, H., Soady, K., Zhang, Q., Gilday, A., Dyer, J.M., and Graham, I.A. (2009). Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways. *Plant Biotechnol J* 7, 694-703.
- Small, D.M. (1968). A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45, 108-119.
- Soberman, R.J., and Christmas, P. (2003). The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J Clin Invest* 111, 1107-1113.
- Somerville, C., and Browse, J. (1991). Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252, 80-87.
- Song, S.K., Choi, Y., Moon, Y.H., Kim, S.G., Choi, Y.D., and Lee, J.S. (2000). Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid, and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 43, 439-450.
- Sparkes, I.A., Frigerio, L., Tolley, N., and Hawes, C. (2009). The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. *Biochem J* 423, 145-155.
- Srinivasan, R., Hadzic, N., Fischer, J., and Knisely, A.S. (2004). Steatohepatitis and unsuspected micronodular cirrhosis in Dorfman-Chanarin syndrome with documented ABHD5 mutation. *J Pediatr* 144, 662-665.

Stahl, U., Carlsson, A.S., Lenman, M., Dahlqvist, A., Huang, B., Banas, W., Banas, A., and Stymne, S. (2004). Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis. *Plant Physiol* 135, 1324-1335.

Stauch, B., Fisher, S.J., and Cianci, M. (2015). Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J Lipid Res* 56, 2348-2358.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.

Stralfors, P., and Belfrage, P. (1983). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 258, 15146-15152.

Stralfors, P., Bjorgell, P., and Belfrage, P. (1984). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3317-3321.

Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A.W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M.P., and Brasaemle, D.L. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279, 42062-42071.

Sun, Y., and Chen, J. (2008). mTOR signaling: PLD takes center stage. *Cell Cycle* 7, 3118-3123.

Sun, Y., Fang, Y., Yoon, M.S., Zhang, C., Roccio, M., Zwartkruis, F.J., Armstrong, M., Brown, H.A., and Chen, J. (2008). Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8286-8291.

Sussman, J.L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., and Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253, 872-879.

Sutherland, L.N., Capozzi, L.C., Turchinsky, N.J., Bell, R.C., and Wright, D.C. (2008). Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1076-1083.

Sutterlin, H.A., Zhang, S., Silhavy, T.J. (2014). Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196, 3214-3220.

## T

Tanida, I., and Waguri, S. (2010). Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol* 648, 193-214.

Tansey, J.T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D.L., Zee, J.V., Gavrilova, O., Reitman, M.L., Deng, C.X., Li, C., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6494-6499.

Testerink, C., and Munnik, T. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci* 10, 368-375.

Thazar-Poulot, N., Miquel, M., Fobis-Loisy, I., and Gaude, T. (2015). Peroxisome extensions deliver the Arabidopsis SDP1 lipase to oil bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 4158-4163.

Theodoulou, F.L., and Eastmond, P.J. (2012). Seed storage oil catabolism: a story of give and take. *Current opinion in plant biology* 15, 322-328.

Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R., and Graham, I.A. (2005). Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol* 137, 835-840.

Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1976). Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 251, 813-819.



Tornqvist, H., Bjorgell, P., Krabisch, L., and Belfrage, P. (1978). Monoacylmonoalkylglycerol as a substrate for diacylglycerol hydrolase activity in adipose tissue. *J Lipid Res* 19, 654-656.

Tremblay, F., Brule, S., Hee Um, S., Li, Y., Masuda, K., Roden, M., Sun, X.J., Krebs, M., Polakiewicz, R.D., Thomas, G., and Marette, A. (2007). Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14056-14061.

Tumaney, A.W., Shekar, S., and Rajasekharan, R. (2001). Identification, purification, and characterization of monoacylglycerol acyltransferase from developing peanut cotyledons. *J Biol Chem* 276, 10847-10852.

Turpin, S.M., Hoy, A.J., Brown, R.D., Rudaz, C.G., Honeyman, J., Matzaris, M., and Watt, M.J. (2011). Adipose triacylglycerol lipase is a major regulator of hepatic lipid metabolism but not insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 54, 146-156.

Tzen, J.T., and Huang, A.H. (1992). Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *The Journal of cell biology* 117, 327-335.

Tzen, J.T., Lie, G.C., and Huang, A.H. (1992). Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *The Journal of biological chemistry* 267, 15626-15634.

Tzen, J.T., Peng, C.C., Cheng, D.J., Chen, E.C., and Chiu, J.M. (1997). A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination. *Journal of biochemistry* 121, 762-768.

Tzen, J.T.C., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C., and Huang, A.H.C. (1993). Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant physiology* 101, 267-276.

## U

Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859-864.

Uchida, Y., Cho, Y., Moradian, S., Kim, J., Nakajima, K., Crumrine, D., Park, K., Ujihara, M., Akiyama, M., Shimizu, H., Holleran, W.M., Sano, S., and Elias, P.M. (2010). Neutral lipid storage leads to acylceramide deficiency, likely contributing to the pathogenesis of Dorfman-Chanarin syndrome. *J Invest Dermatol* 130, 2497-2499.

Uchida, Y., and Holleran, W.M. (2008). Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J Dermatol Sci* 51, 77-87.

## V

van der Schoot, C., Paul, L.K., Paul, S.B., and Rinne, P.L. (2011). Plant lipid bodies and cell-cell signaling: a new role for an old organelle? *Plant Signal Behav* 6, 1732-1738.

van Leeuwen, W., Okresz, L., Bogre, L., and Munnik, T. (2004). Learning the lipid language of plant signalling. *Trends Plant Sci* 9, 378-384.

van Tilbeurgh, H., Egloff, M.P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., and Cambillau, C. (1993). Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 362, 814-820.

Vanoosthuysen, V., Tichtinsky, G., Dumas, C., Gaude, T., and Cock, J.M. (2003). Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the Brassica oleracea S locus receptor kinase. *Plant Physiol* 133, 919-929.

Vaughan, M., Berger, J.E., and Steinberg, D. (1964). Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue. *J Biol Chem* 239, 401-409.

Verger, R., and De Haas, G.H. (1973). Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem Phys Lipids* 10, 127-136.



Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.H., and Sul, H.S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279, 47066-47075.

## W

Walther, T.C., and Farese, R.V., Jr. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* 81, 687-714.

Wang, C.S., McConathy, W.J., Kloer, H.U., and Alaupovic, P. (1985). Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* 75, 384-390.

Wang, H., Bell, M., Sreenivasan, U., Hu, H., Liu, J., Dalen, K., Londos, C., Yamaguchi, T., Rizzo, M.A., Coleman, R., Gong, D., Brasaemle, D., and Sztalryd, C. (2011). Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem* 286, 15707-15715.

Wang, S.P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M.A., Levy, E., Robert, M.F., Pan, L., Oligny, L., and Mitchell, G.A. (2001). The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res* 9, 119-128.

Wang, X. (2004). Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7, 329-336.

Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F., and Hwang, J.K. (1989). How do serine proteases really work? *Biochemistry* 28, 3629-3637.

Wassmer, T., Attar, N., Harterink, M., van Weering, J.R., Traer, C.J., Oakley, J., Goud, B., Stephens, D.J., Verkade, P., Korswagen, H.C., and Cullen, P.J. (2009). The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev Cell* 17, 110-122.

Wasternack, C. (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development--applied aspects. *Biotechnol Adv* 32, 31-39.

Watt, M.J., van Denderen, B.J., Castelli, L.A., Bruce, C.R., Hoy, A.J., Kraegen, E.W., Macaulay, L., and Kemp, B.E. (2008). Adipose triglyceride lipase regulation of skeletal muscle lipid metabolism and insulin responsiveness. *Mol Endocrinol* 22, 1200-1212.

Wei, Y., Contreras, J.A., Sheffield, P., Osterlund, T., Derewenda, U., Kneusel, R.E., Matern, U., Holm, C., and Derewenda, Z.S. (1999). Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase. *Nat Struct Biol* 6, 340-345.

Welch, C., Santra, M.K., El-Assaad, W., Zhu, X., Huber, W.E., Keys, R.A., Teodoro, J.G., and Green, M.R. (2009). Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2. *Cancer Res* 69, 6782-6789.

Wertz, P.W. (1992). Epidermal lipids. *Semin Dermatol* 11, 106-113.

Wertz, P.W., and Downing, D.T. (1990). Metabolism of linoleic acid in porcine epidermis. *J Lipid Res* 31, 1839-1844.

Widmann, M., Juhl, P.B., and Pleiss, J. (2010). Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *BMC Genomics* 11, 123.

Wilson, P.A., Gardner, S.D., Lambie, N.M., Commans, S.A., and Crowther, D.J. (2006). Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 47, 1940-1949.

Wimalasekera, R., Tebartz, F., and Scherer, G.F. (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* 181, 593-603.

Winkler, F.K., D'Arcy, A., and Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343, 771-774.

Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A., and Bickel, P.E. (2005). S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem* 280, 19146-19155.

Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Tzekov, A., Croce, M.A., Gropler, M.C., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Kern, P.A., Finck, B.N., and Bickel, P.E. (2006). OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 55, 3418-3428.

Wolins, N.E., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A., Bensh, K.G., and Bickel, P.E. (2003). Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem* 278, 37713-37721.

Wu, J.W., Wang, S.P., Alvarez, F., Casavant, S., Gauthier, N., Abed, L., Soni, K.G., Yang, G., and Mitchell, G.A. (2011). Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology* 54, 122-132.

## X

Xie, M., and Roy, R. (2015). The Causative Gene in Chanarian Dorfman Syndrome Regulates Lipid Droplet Homeostasis in *C. elegans*. *PLoS Genet* 11, e1005284.

Xie, X., Langlais, P., Zhang, X., Heckmann, B.L., Saarinen, A.M., Mandarino, L.J., and Liu, J. (2014). Identification of a novel phosphorylation site in adipose triglyceride lipase as a regulator of lipid droplet localization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306, E1449-1459.

Xu, J., Carlsson, A.S., Francis, T., Zhang, M., Hoffman, T., Giblin, M.E., and Taylor, D.C. (2012). Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on re-acylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biol* 12, 4.

## Y

Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2006). MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 281, 14232-14240.

Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S., and Osumi, T. (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* 279, 30490-30497.

Yamaguchi, T., Omatsu, N., Morimoto, E., Nakashima, H., Ueno, K., Tanaka, T., Satouchi, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2007). CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res* 48, 1078-1089.

Yamaguchi, T., and Osumi, T. (2009). Chanarin-Dorfman syndrome: deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase. *Biochim Biophys Acta* 1791, 519-523.

Yang, L., Ding, Y., Chen, Y., Zhang, S., Huo, C., Wang, Y., Yu, J., Zhang, P., Na, H., Zhang, H., Ma, Y., and Liu, P. (2012). The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res* 53, 1245-1253.

Yang, X., Lu, X., and Liu, J. (2010a). Identification of a novel splicing isoform of murine CGI-58. *FEBS Lett* 584, 903-910.

Yang, X., Lu, X., Lombes, M., Rha, G.B., Chi, Y.I., Guerin, T.M., Smart, E.J., and Liu, J. (2010b). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* 11, 194-205.

Yang, Y., and Lowe, M.E. (2000). The open lid mediates pancreatic lipase function. *J Lipid Res* 41, 48-57.

Yatsu, L.Y., and Jacks, T.J. (1972). Spherosome membranes: half unit-membranes. *Plant physiology* 49, 937-943.

Young, S.G., and Zechner, R. (2013). Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* 27, 459-484.

## Z

- Zandbergen, F., Mandard, S., Escher, P., Tan, N.S., Patsouris, D., Jatkoe, T., Rojas-Caro, S., Madore, S., Wahli, W., Tafuri, S., Muller, M., and Kersten, S. (2005). The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem J* **392**, 313-324.
- Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* **50**, 3-21.
- Zechner, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Lass, A., and Zimmermann, R. (2005). Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* **16**, 333-340.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., and Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* **15**, 279-291.
- Zhang, C., Wendel, A.A., Keogh, M.R., Harris, T.E., Chen, J., and Coleman, R.A. (2012). Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1667-1672.
- Zhang, J., Xu, D., Nie, J., Han, R., Zhai, Y., and Shi, Y. (2014). Comparative gene identification-58 (CGI-58) promotes autophagy as a putative lysophosphatidylglycerol acyltransferase. *J Biol Chem* **289**, 33044-33053.
- Zhang, L., Godzik, A., Skolnick, J., and Fetrow, J.S. (1998). Functional analysis of the Escherichia coli genome for members of the alpha/beta hydrolase family. *Fold Des* **3**, 535-548.
- Zhang, M., Fan, J., Taylor, D.C., and Ohlrogge, J.B. (2009). DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in Arabidopsis triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell* **21**, 3885-3901.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., and Wang, X. (2004). Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9508-9513.
- Zhang, Y.M., and Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 222-233.
- Zimmermann, R., Haemmerle, G., Wagner, E.M., Strauss, J.G., Kratky, D., and Zechner, R. (2003). Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res* **44**, 2089-2099.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386.
- Zolman, B.K., Silva, I.D., and Bartel, B. (2001). The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol* **127**, 1266-1278.
- Zou, J., Hallberg, B.M., Bergfors, T., Oesch, F., Arand, M., Mowbray, S.L., and Jones, T.A. (2000). Structure of Aspergillus niger epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. *Structure* **8**, 111-122.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., and Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et biophysica acta* **1469**, 101-120.

# ANNEXES

**Tableau S1 :** Nom et séquence des différentes amorces utilisées et leurs gènes cibles. Les sites de clivage par les enzymes de restriction sont soulignés, le codon *start* (ATG) est en gras, et les bases mutées pour la mutagenèse dirigée sont en italique.

Nom	Cible	Séquence 5→3'
AN011	<i>Mm</i> CGI-58 Rev	TGCT <u>GCGGCCG</u> CTCAGTCTACTGTGTGGC
AN013	<i>Mm</i> CGI-58 Fwd	CAGTCA <u>ACATG</u> TTAGCGATGGCGGCG
AN021	pET28 T7 promoteur Fwd	TTAATACGACTCACTATAGG
AN022	<i>At</i> CGI-58 FL Fwd	TGC <u>ACCATG</u> GACTTGAGCCGTTTGTCTT
AN023	<i>At</i> CGI-58 FL et Trc Rev	TGCT <u>GCGGCCG</u> CAACCAATCGTAGACCATC
AN024	<i>At</i> CGI-58 FL et Trc Rev	TGCT <u>GCGGCCG</u> CCTAAACCAATCGTAGACC
AN025	<i>At</i> CGI-58 Trc Fwd	TGC <u>ACCATG</u> GAATCAAGATGGAAAATTTTGTG
AN026	<i>At</i> CGI-58 FL Fwd	GTC <u>ACTCGAG</u> AAAAGA <b>ATG</b> AACTTGAGCCGTTTTG
AN027	<i>At</i> CGI-58 Trc Fwd	GTC <u>ACTCGAG</u> AAAAGA <b>ATG</b> AAATCAAGATGGAAAATTTTGTG
AN028	pET28 T7 terminateur	CCAAGGGGTTATGCTAG
AN029	pGAP promoteur Fwd	GGAAACCACCAGAATCG
AN032	<i>Mm</i> ATGL Rev	TGCT <u>GCGGCCG</u> CTCAGCAAGGCGGGAG
AN035	<i>At</i> ATGL FL Fwd	GTC <u>ACTCGAG</u> AAAAGA <b>ATG</b> GCGATGTCTCTCC
AN036	<i>At</i> ATGL Trc Fwd	GTC <u>ACTCGAG</u> AAAAGA <b>ATG</b> TGCTCTGGTGGGTCTT
AN037	<i>At</i> ATGL Rev	TGCT <u>GCGGCCG</u> CGCTAGTAGGAATCTCTTG
AN047	<i>Mm</i> ATGL Rev	CCTCCTGGACACCTC
AN048	<i>At</i> CGI-58 FL et Trc Rev	TACATAAGGCGTCTTGAGG
AN051	<i>Mm</i> ATGL Rev	TGCT <u>GCGGCCG</u> CGCAAGGCGGGAGGCCAGGT
AN052	<i>Mm</i> ATGL Fwd	CAGTCACAT <b>ATG</b> TTCCCGAGGGAGACC
AN053	<i>Mm</i> ATGL Fwd	CAGTCAC <b>CATG</b> TTCCCGAGGGAGACCAA
AN054	<i>At</i> ATGL Rev	CTCACCGGTGGCAACAG
AN059	<i>Mm</i> ATGL Fwd	CGGAGAGAACGTCATCA
AN060	<i>Mm</i> ATGL Rev	GCACCATCATGGCCG

AN061	<i>Mm</i> ATGL Fwd	GGAGGCCTGTGTGGAACC
AN062	<i>Mm</i> ATGL Rev	GAGATGCCCAGGCGTCCA
AN120	<i>At</i> CGI-58 FL Fwd	GTCACAT <u>ATG</u> AACCTTGAGCCGTTTTGCTT
AN121	<i>At</i> CGI-58 Trc Fwd	GTCACAT <u>ATG</u> AATCAAGATGGAAAATTTTGTG
AN180	plsC Fwd	TCACCA <u>ATGG</u> TATATATCTTTCGTCTTATTATTACCG
AN181	plsC Rev	TGCTG <u>CGGCCG</u> CTTAAACTTTTCCGGCGGCTTC
AN193	<i>At</i> CGI-58 Trc S199N Rev	ATAGCCTCCAAAATTATGTCCTAATAG
AN212	<i>Mm</i> CGI-58 N155S Fwd	TTGCTTGGACACTCCCTGGGAGGGTTC
AN213	<i>Mm</i> CGI-58 N155S Rev	GAACCCCTCCCAGGGAGTGTCCAAGCAA
AN217	T7RNA polymérase Rev	GTGCAATCATCTTAGGGAGTA
AN233	pgsA Fwd	TCAACAT <u>GTG</u> CATTTAATATCCCTACGTTGCTTAC
AN234	pgsA Rev	TGCTG <u>CGGCCG</u> CTCACTGATCAAGCAAATCTGCA
AN237	<i>At</i> CGI-58 Trc S199N Fwd	CATAATTGGAGGCTATGTTGCTAAA
AN256	<i>At</i> CGI-58 Trc H379A Fwd	CCACAGGGTGGTGCTTTTGTGTTTCATA
AN257	<i>At</i> CGI-58 Trc H379A Rev	TATGAACACAAAAGCACCACCCTGTGG
AN258	<i>At</i> CGI-58 Trc D384A Fwd	TTTGTGTTTCATAGCCAACCCAATTGGT
AN259	<i>At</i> CGI-58 Trc D384A Rev	ACCAATTGGGTTGGCTATGAACACAAA
AN260	CotA Fwd	CAGTCAACAT <u>GTG</u> CACTTGAAAAATTTGTGGATGCT
AN261	CotA Rev	GATGCTG <u>CGGCCG</u> CTTATTTATGGGGATCAGTTATATCC



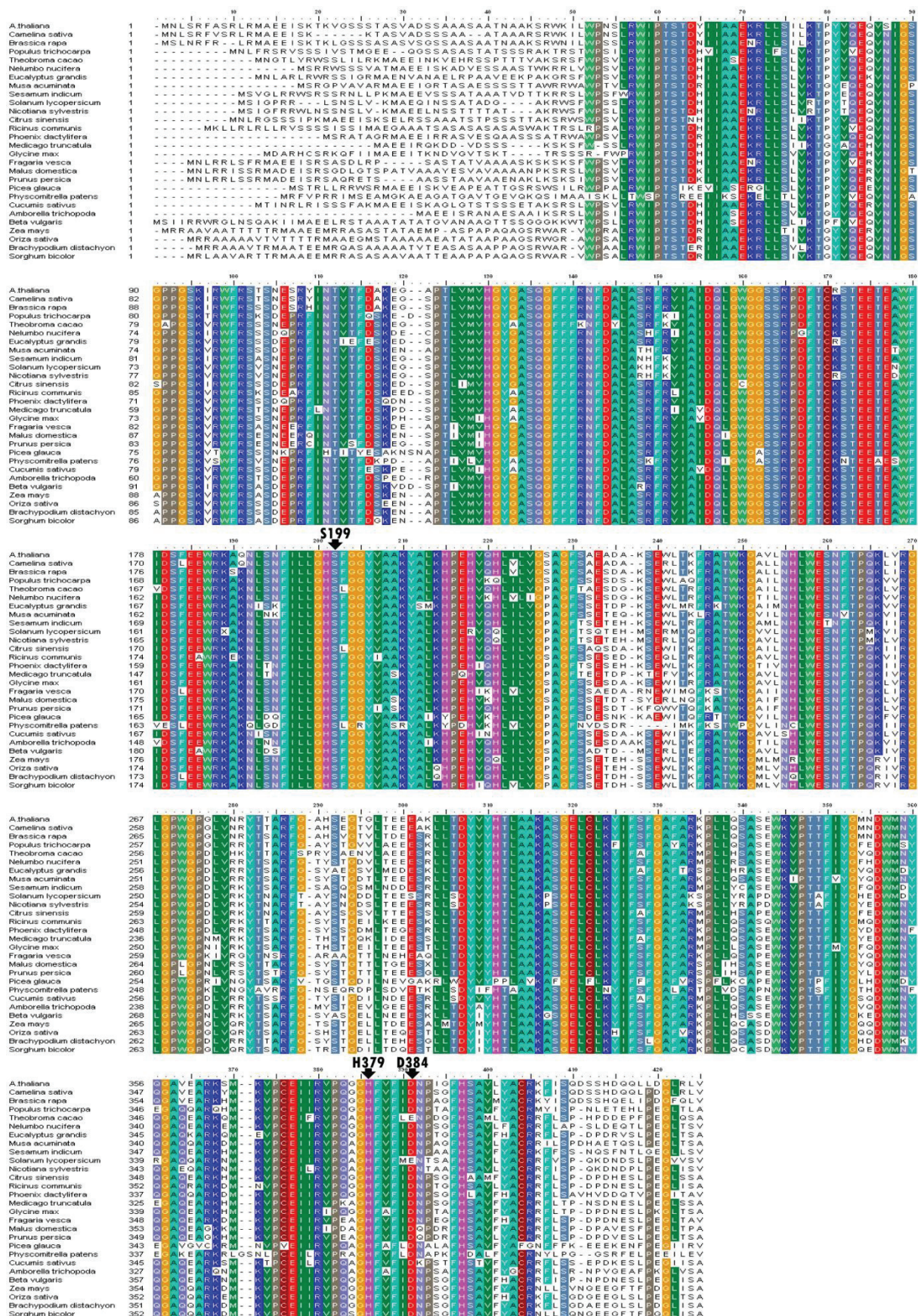


Figure S1 : Alignment de séquence des protéines CGI-58 de plante.



## **Annexe 3 : Résultat d'analyse par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse de la protéine CGI-58 et GroEL.**

### **Echantillons :**

Les bandes de gel découpées proviennent d'un gel mono-dimensionnel coloré au bleu de coomassie.

1	40 kDa <i>Mus musculus</i>
2	45 kDa <i>Mus musculus</i>
3	60 kDa <i>Mus musculus</i>

### **Traitements des Echantillons :**

La préparation de l'échantillon est faite par un robot de "*Liquid Handling*" (Freedom Evo TECAN) selon le programme "Digest\_Blue\_Extract4" avec Réduction / Alkylation / Digestion (Trypsine PROMEGA) sur 8 heures et Extraction des peptides. Les surnageant sont ensuite séchés au speed vacuum. Les peptides sont ensuite repris dans 10µl d'eau / TFA 0.1%.

### **Dessalage et mesure de masse des peptides issus de la digestion trypsique :**

Les peptides sont dessalés sur ZipTip selon le protocole millipore. Ils sont ensuite élués par 3 µl d'acétonitrile/eau (0,1 % TFA) (70:30).

1µl solution peptidique est directement déposé sur la cible avec 1µl d'une solution saturée de matrice à 10mg/ml d'acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique dans acétonitrile/eau (0,1 % TFA) (70:30).

Les mesures de masse sont effectuées en automatique et réalisées en mode Réflecteur positif (méthode RP\_PepMix2) sur un spectromètre de masse de type Microflex II (BRUKER). L'étalonnage est réalisé toutes les 8 acquisitions avec une solution de calibration standard (Pep\_Cal) de chez BRUKER. Les pics repérés et mesurés sont les valeurs mono-isotopiques des [M+H]<sup>+</sup> au 12C. L'assignation de ces mono-isotopes est faite par un Macro type pour le PMF(PMF\_FAMS) ; en suit une vérification manuelle de cette assignation.

### **Identification des protéines par une recherche dans les banques de données :**

Pour l'identification des protéines, nous utilisons les [M+H]<sup>+</sup> des valeurs mono-isotopiques au 12C des massifs peptidiques. Les valeurs expérimentales seront comparées aux valeurs théoriques des peptides stockés dans les banques de données. Pour cette recherche, nous indiquerons l'alkylation des cystéines par l'iodoacétamide en carbamidométhylcystéine, l'oxydation des méthionines ainsi qu'une différence de masse de 50 à 100 ppm. Nous acceptons un site à la trypsine non clivé.

Les recherches sont effectuées avec : **Mascot** (Serveur MaP) ; contre la banque NCBI nr 20120228 (17 333 135 séquences) puis réduite à "*Mus musculus*" (145 056 séquences).

### **Echantillon numéro 1 :**

gi|49176012 Mass : 38737 Score : **221** Expect : 1.4e-15 Matches : 24

DNA-binding transcriptional repressor [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]

### **Echantillon numéro 2 :**

gi|13385690 Mass : 39529 Score : **89** Expect : 0.00018 Matches : 10

1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase ABHD5 [Mus musculus]

### **Echantillon numéro 3 :**

gi|354990985 Mass : 58062 Score : **336** Expect : 4.4e-27 Matches : 36

GroEL [synthetic construct]

# Article 1 : Accepté

---

RESEARCH ARTICLE

# Reassessing the Potential Activities of Plant CGI-58 Protein

Abdallah Khatib, Yani Arhab, Assia Bentebibel, Abdelkarim Abousalham, Alexandre Noiriel\*

Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires UMR 5246 CNRS, Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

\* [alexandre.noiriel@univ-lyon1.fr](mailto:alexandre.noiriel@univ-lyon1.fr)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Khatib A, Arhab Y, Bentebibel A, Abousalham A, Noiriel A (2016) Reassessing the Potential Activities of Plant CGI-58 Protein. PLoS ONE 11(1): e0145806. doi:10.1371/journal.pone.0145806

**Editor:** Monika Oberer, University of Graz, AUSTRIA

**Received:** August 2, 2015

**Accepted:** December 9, 2015

**Published:** January 8, 2016

**Copyright:** © 2016 Khatib et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** AK was supported by grant #2012-11 from the Lebanese Association for Scientific Research, [www.laser-lb.org](http://www.laser-lb.org). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); ATGL, Adipose triglyceride lipase; CGI-58, Comparative Gene Identification-58; DOPC, 1,2-Dioleoyl-sn-

## Abstract

Comparative Gene Identification-58 (CGI-58) is a widespread protein found in animals and plants. This protein has been shown to participate in lipolysis in mice and humans by activating Adipose triglyceride lipase (ATGL), the initial enzyme responsible for the triacylglycerol (TAG) catabolism cascade. Human mutation of CGI-58 is the cause of Chanarin-Dorfman syndrome, an orphan disease characterized by a systemic accumulation of TAG which engenders tissue disorders. The CGI-58 protein has also been shown to participate in neutral lipid metabolism in plants and, in this case, a mutation again provokes TAG accumulation. Although its roles as an ATGL coactivator and in lipid metabolism are quite clear, the catalytic activity of CGI-58 is still in question. The acyltransferase activities of CGI-58 have been speculated about, reported or even dismissed and experimental evidence that CGI-58 expressed in *E. coli* possesses an unambiguous catalytic activity is still lacking. To address this problem, we developed a new set of plasmids and site-directed mutants to elucidate the *in vivo* effects of CGI-58 expression on lipid metabolism in *E. coli*. By analyzing the lipid composition in selected *E. coli* strains expressing CGI-58 proteins, and by reinvestigating enzymatic tests with adequate controls, we show here that recombinant plant CGI-58 has none of the proposed activities previously described. Recombinant plant and mouse CGI-58 both lack acyltransferase activity towards either lysophosphatidylglycerol or lysophosphatidic acid to form phosphatidylglycerol or phosphatidic acid and recombinant plant CGI-58 does not catalyze TAG or phospholipid hydrolysis. However, expression of recombinant plant CGI-58, but not mouse CGI-58, led to a decrease in phosphatidylglycerol in all strains of *E. coli* tested, and a mutation of the putative catalytic residues restored a wild-type phenotype. The potential activities of plant CGI-58 are subsequently discussed.

## Introduction

The  $\alpha/\beta$  hydrolase-type protein Comparative Gene Identification-58 (CGI-58), also called ABDH5, is found in various organisms, such as mammals [1], insects [1], nematodes [2], birds [3] and plants [4], and it plays an important role in lipid metabolism, at least in mammals and

glycero-3-phosphocholine; DOPG, 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol; DPPC, 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DPPG, 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol; ICT1, Increased Copper Tolerance 1; IPTG, Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside; LPAAT, Lysophosphatidic acid acylCoA acyltransferase; LPGAT, Lysophosphatidylglycerol acylCoA acyltransferase; LPA, Lysophosphatidic acid; LPG, Lysophosphatidylglycerol; PA, Phosphatidic acid; PC, Phosphatidylcholine; PE, Phosphatidylethanolamine; PG, Phosphatidylglycerol; pgsA, Phosphatidylglycerophosphate synthase; PLA<sub>2</sub>, Phospholipase A<sub>2</sub>; PLD, Phospholipase D; plsC, 1-acyl-*sn*-glycero-3-phosphate acyltransferase; POPG, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol; T7RP, T7 RNA polymerase; TAG, Triacylglycerol; TLL, *Thermomyces lanuginosus* lipase.

in plants. In these two clades of evolution, CGI-58 mutations provoke various neutral lipid disorders characterized, predominantly, by TAG accumulation in non-fat storing cells, such as the mesophyll cells of plants and the non-adipose tissues of mammals (skin, muscle cells etc.). Originally, human CGI-58 was described as being closely related to ICT1 (Increased Copper Tolerance 1) [5]. ICT1 is a yeast protein identified by functional screening as being involved in tolerance to copper toxicity [6] and shown, by microarray analysis, to participate in isooctane tolerance [7].

In plants, a mutation in the gene for CGI-58 leads to an accumulation of TAG, with levels more than 10 times higher than in wild-type *Arabidopsis* leaves, a non-fat storing organ [4]. CGI-58 co-regulates lipid homeostasis, too, by interacting with Peroxisomal ABC Transporter (PXA1) [8], a protein that serves as a transporter of various substrates into peroxisomes and which is also required for fatty acid catabolism by  $\beta$ -oxidation [9]. In addition to its role as a lipid turnover regulator, it has been shown that CGI-58 also has an effect on polyamines, which have been described to be important molecules in growth and stress responses. In plants, CGI-58 regulates polyamine metabolism [10] by interacting with spermidine synthase 1 (SPDS1). Structurally, plant CGI-58 possesses at least two characteristic motifs. The first is a GX SXG motif found in lipases, containing a serine that, together with aspartate and histidine, is a member of a putative catalytic triad present in the  $\alpha/\beta$  hydrolase-type family [1] to which plant CGI-58 belongs. The second one is a putative HX<sub>4</sub>D motif that is indispensable for acyltransferase activity [11]. An initial enzymatic study [12], published in 2009, showed that recombinant plant CGI-58 purified from *E. coli* possesses several activities, the main one being the catalysis of a lysophosphatidic acid (LPA) acylCoA acyltransferase (LPAAT) reaction. This study also reported hydrolase activities for TAG and phosphatidylcholine (PC) that were much less than 0.01% of the acyltransferase activity [12].

In mammals, the mutation of CGI-58 is responsible for the Chanarin-Dorfman syndrome, a neutral lipid storage disease with ichthyosis (NLSOI), characterized by TAG accumulation within the epidermis, brain and liver [13]. The protein CGI-58 interacts with perilipin [14] and Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) activating, by a factor of 20, the lipolytic activity of ATGL [15]. In addition, the mammalian CGI-58 protein possesses an acyltransferase motif, HX<sub>4</sub>D, and harbors a mutated GXNXG lipase motif, whereby a suspected inactive asparagine replaces the catalytic serine [1]. This protein has been shown to participate in TAG homeostasis, for example in cardiac and skeletal muscles [16]. Another independent enzymatic study of CGI-58 proteins has shown that mouse CGI-58 expressed in *E. coli* was also able, as the plant homolog, to catalyze an acyltransferase reaction [17]. However, the same authors demonstrated later that this activity was, in reality, an artifact due to a contaminant from *E. coli* that co-purified with the protein [18]. The contaminant was identified as plsC, the enzyme responsible for phosphatidic acid (PA) synthesis in *E. coli* through the transfer of the acyl group from acylCoA to LPA. It would be easy to imagine that the LPAAT activity, previously described in recombinant plant CGI-58 purified from *E. coli*, could originate from the same contaminant identified during the characterization of recombinant mouse CGI-58 purified from *E. coli*, raising reasonable doubts regarding the potential activity of recombinant plant CGI-58. More surprising results have emerged from a recent paper describing lysophosphatidylglycerol acylCoA acyltransferase (LPGAT) activity for human CGI-58, expressed in mammalian cells [19], questioning the putative activities and involvement of plant and mammalian CGI-58 in phospholipid synthesis.

Although the role of CGI-58 as a regulator of lipid metabolism is quite clear, its catalytic activity is still elusive and questionable. In order to reassess the putative activities of plant CGI-58, we tested the phenotype of several *E. coli* strains defective in lipid metabolism. We used new *in vivo* approaches to demonstrate that recombinant plant CGI-58 proteins are not able, to rescue an LPAAT mutant of *E. coli* nor to confer resistance to copper, which we have

demonstrated has a toxic effect alleviated by moderate LPAAT activity. Likewise, these recombinant plant proteins did not show any detectable *in vitro* LPAAT activity, using purified protein obtained with an optimized protocol under native conditions [18]. Here, we report that the expression of plant CGI-58 in another *E. coli* strain deficient in phosphatidylglycerol (PG) synthesis could not restore the synthesis of PG in this genetic background, compared to an authentic PG synthase as prokaryotic *pgsA*. Also, more surprisingly, plant CGI-58 expression leads to a decrease in PG but not in phosphatidylethanolamine (PE) content, suggesting a role for CGI-58 in PG catabolism. Interestingly, a decrease in PG was also observed in all the tested *E. coli* strains expressing plant CGI-58 and we found that this effect was potentially due to the catalytic activity of CGI-58, via a mutation of the seryl residue within the GX SXG lipase motif at position 199. Using the decrease in PG as a phenotype, we tested the involvement of several residues, and we were able to show that only the histidyl, and not the aspartyl, residue belonging to the HX<sub>4</sub>D acyltransferase motif was implicated in the decrease of PG content.

## Materials and Methods

### Materials

The lipids dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), 1-palmitoyl, 2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG), 1-palmitoyl, 2-oleoylphosphatidylethanolamine and 1-oleoyllysoPG were purchased from Avanti Polar (Alabaster, Alabama, USA) and 1-oleoyllysophosphatidic acid, oleic acid, and triolein were purchased from Sigma Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France). Strains MN7 [20], SM2-1 [21], and MG1655 were obtained from the *E. coli* Genetic Stock Center (Yale University). BL21(DE3) strain and plasmids pACYC184 and pACYC177 were obtained from New England Biolabs. Plasmid pAR1219 was from Sigma Aldrich Chimie. *Mus musculus* CGI-58 (*MmCGI-58*) was a gift of Dr Zechner (University of Graz, Austria), and pET28a-*MmCGI-58*-12His (referred to as *MmCGI-58*) was a gift from Prof. Brasaemle (Rutgers, The State University of New Jersey, USA). The *Arabidopsis thaliana* full-length cDNA clone RAFL19-16-I19, coding *Arabidopsis* CGI-58 (*AtCGI-58*), was developed by the plant genome project at the RIKEN Genomic Sciences Center (Japan) [22,23]. All strains were grown at 37°C except MN7 and SM2-1, which were kept at 30°C. When necessary, LB plates contained 250 µM CuSO<sub>4</sub>, 1 mM ABTS and 1 µM IPTG. Antibiotic concentrations were 0.1 µg/µL for kanamycin, 0.02 µg/µL for chloramphenicol, 0.05 µg/µL for streptomycin, 0.1 µg/µL for ampicillin and 0.01 µg/µL for tetracycline. Pre-coated TLC-sheets ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey Nagel) were used for lipids analysis in *E. coli*. Silica Gel G & GF Preparative Uniplate (Analtech, Newark, USA) were used for tests involving radioactivity. *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) was kindly provided by Dr S. Patkar (Novo-Nordisk, Copenhagen, Denmark). Phospholipase A<sub>2</sub>, from porcine pancreas, and monoclonal anti-poly-Histidine coupled to peroxidase antibody were purchased from Sigma Aldrich Chimie. Radio-labeled lipids [dipalmitoyl-1-<sup>14</sup>C] phosphatidylcholine (111 mCi / mmol), [oleoyl-1-<sup>14</sup>C] oleoyl Coenzyme A (53.7 mCi / mmol) and [9,10-<sup>3</sup>H(N)] triolein (108 Ci / mmol) were all purchased from Perkin-Elmer.

### Enzymatic Activities

LPAAT, phospholipase and triglyceride lipase activities were measured under the same conditions as described in [12], with some modifications. Basically, LPAAT activity was measured, in the presence of 50 µM of lysoPA and 10 µM oleoylCoA (13 000 dpm / test) in a 50 mM potassium phosphate buffer, at pH 7.0 for 10 minutes, and in a final volume of 100 µL. Phospholipase activity was quantified for 40 minutes, in the presence of 100 µM of dipalmitoylPC (20 000 dpm / test), in a 50 mM Tris HCl buffer, at pH 7.5, with 2 mM DTT and 1 µg of

proteins in a final volume of 100  $\mu$ L. The reaction mixture was sonicated for 5 min before adding the enzyme. Triglyceride lipase activity was measured in the presence of 100  $\mu$ M of triolein (100 000 dpm / test) and 100  $\mu$ M of sodium taurocholate in a 50 mM Tris HCl buffer, at pH 7.5 for 40 minutes, with 1  $\mu$ g of protein in a final volume of 100  $\mu$ L. Again, the reaction mixture was sonicated for 5 min before adding the enzyme. For all tests, the temperature was set to 32°C. After stopping the reaction by adding 100  $\mu$ L of 0.1 N HCl, lipid products were extracted, with the appropriate unlabeled substrates and expected unlabeled products as carriers using chloroform:methanol (2:1, v/v) and then separated by TLC on Silica Gel G & GF Preparative Uniplates with unlabeled, but identical products used as the reference.

Radiolabeled dipalmitoylPG (DPPG) was synthesized by transphosphatidylolation from [ $^{14}$ C]-dipalmitoylPC (DPPC) using phospholipase D (PLD) in the presence of glycerol. PC substrate, composed of 35.5 nmol of unlabeled DPPC and 4.5 nmol of [ $^{14}$ C]-DPPC, was sonicated for 10 min to form micelles in 150  $\mu$ L of buffer containing 0.83 mM SDS, 0.83 mM Triton X100, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 500 mM glycerol and 50 mM Tris-HCl, pH 8. 200 ng of purified recombinant *Vigna unguiculata* PLD [24] was added and the reaction mixture was incubated for 1 h at 30°C. The reaction was terminated by adding 100  $\mu$ L of 0.1 N HCl and lipids were extracted with a mix of chloroform:methanol (2:1, v/v). The lipids were then separated by TLC using a mix of chloroform:methanol:acetic acid (65:25:10, v/v/v). [ $^{14}$ C]-DPPG was scraped from the silica plate, re-dissolved in chloroform:methanol (2:1, v/v), filtered and then stored at -20°C until further use. Assuming that enzymatic conversions of labeled and unlabeled PC were equivalent, the specific activity of radiolabeled DPPG was then calculated as 250 dpm / pmol.

The putative PG acylhydrolase activity of recombinant CGI-58 protein was tested using either the purified truncated version of AtCGI-58 (AtCGI-58 Trc) or cell extracts of *E. coli* expressing AtCGI-58 Trc or the S199N mutant version. A reaction mixture containing 10 nmol of DOPG and 20 pmol of [ $^{14}$ C]-DPPG (250 dpm/pmol) was dispersed, by sonication, for 5 min in a final volume of 100  $\mu$ L of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. Next, 7  $\mu$ g of purified AtCGI-58 Trc or 10  $\mu$ g of proteins from the cell extract were added and the reaction mixture was incubated, at 30°C, for 2 h for the purified fraction or 30 min for the cell extract. Reactions were terminated by adding 100  $\mu$ L of 0.1 N HCl. Lipids were extracted with chloroform:methanol (2:1, v/v) and separated, by TLC, using a chloroform:methanol:acetic acid (65:25:10, v/v/v) solution. The area containing free fatty acids was scraped and then quantified by scintillation counting.

## Cloning

cDNAs coding for MmCGI-58 and for full-length (AtCGI-58 FL) or truncated AtCGI-58 (AtCGI-58 Trc) were amplified by PCR with primers 01 and 02, 03 and 04, 03 and 05, respectively. The primers are listed in Table 1. All constructs harbor an *Nde*I site and a sequence coding for a 6-Histidine tag at the 5' end, together with a *Not*I restriction site at the 3' end. PCR products were digested with *Not*I and *Nde*I, purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), and then ligated into the pET28b plasmid (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) digested by the same restriction enzymes. *CotA* was amplified with primers 18 and 19, harboring a *Pci*I and a *Not*I site, respectively, and cloned in the same way except that *Pci*I was used instead of *Nde*I for digesting the PCR product. All constructs were verified by sequencing (Eurofins MWG, Ebersberg, Germany).

The pYAT7 plasmid (8694 bp) (accession number KT970713) was constructed by excising the *lacUV5-T7 RNA polymerase (T7RP)* fragment from the pAR1219 plasmid with *Bam*HI, then cloning it into the *Bam*HI site of the plasmid pACYC184. The orientation of the insert was confirmed by sequencing the construct with primer 06 (Table 1), located at the 5' end of



**Table 1. List of primers used.** Restriction sites are underlined, start codons are in bold, and mutated bases for site-directed mutagenesis are italicized.

Primer name	Target	Sequence 5'→3'
01	MmCGI-58 Fwd	CAGTCAAC <b>ATG</b> T TAGCGATGGCGGCG
02	MmCGI-58 Rev	TGCTGCGGCCGCTCAGTCTACTGTGTGGC
03	AtCGI-58 FL Fwd	GTCACAT <b>ATG</b> AACCTTGAGCCGTTTGTGCTT
04	AtCGI-58 FL and Trc Rev	TGCTGCGGCCGCTAAACCAATCGTAGACC
05	AtCGI-58 Trc Fwd	GTCACAT <b>ATG</b> AAATCAAGATGGAAAATTTGTG
06	TetC Fwd	ATGAAATCTAACAATGCGCTCATC
07	T7RNA polymerase Rev	GTGCAATCATCTTAGGGAGTA
08	plsC Fwd	TCACC <b>ATG</b> GTATATATCTTTTCGTCTATTATTACCG
09	plsC Rev	TGCTGCGGCCGCTTAAACTTTTCCGGCGGCTTC
10	pgsA Fwd	TCAAC <b>ATG</b> TCATTTAATATCCCTACGTTGCTTAC
11	pgsA Rev	TGCTGCGGCCGCTCACTGATCAAGCAAATCTGCA
12	AtCGI-58 Trc S199N Fwd	CATAATTTTGAGGCTATGTTGCTAAA
13	AtCGI-58 Trc S199N Rev	ATAGCCTCCAAAATATGTCCTAATAG
14	AtCGI-58 Trc H379A Fwd	CCACAGGGTGGTGCTTTTGTGTTTCATA
15	AtCGI-58 Trc H379A Rev	TATGAACACAAAAGCACCACCTGTGG
16	AtCGI-58 Trc D384A Fwd	TTTGTGTTTCATAGCCAACCAATGTT
17	AtCGI-58 Trc D384A Rev	ACCAATTGGGTTGGCTATGAACACAAA
18	CotA Fwd	CAGTCAAC <b>ATG</b> TCACTTGAAAAATTTGTGGATGCT
19	CotA Rev	GATGCTGCGGCCGCTTATTTATGGGGATCAGTTATATCC

doi:10.1371/journal.pone.0145806.t001

*tcR*. The sequence between the *lacI* promoter and the *T7RP* open reading frame was also obtained from sequencing with the reverse primer 07 (Table 1), located at the 5' end of *T7RP*. The exact size of the plasmid was calculated from the aforementioned sequences obtained from sequencing reactions, using information provided by [25], and from the pACYC184 sequence (accession number X06403.1).

In order to generate pAKT7 (accession number KT970712), a vector conferring resistance to ampicillin and allowing the inducible expression of the T7RNA polymerase, the pYAT7 plasmid was digested by HindIII and SalI and the pACYC177 plasmid was digested by HindIII and XhoI. Since *SalI* and *XhoI* are compatible sites, the fragment containing the *T7RNA polymerase* sequence, roughly 5000 bp long and resulting from digested pYAT7, was then ligated into the kanamycin resistance cassette of the pACYC177 plasmid.

The gene coding for *plsC* was amplified from the genome of the *E. coli* strain BL21(DE3), by PCR, using primers 08 and 09 (Table 1) or from the strain SM2-1 for the *plsC*\*G39E variant. Amplification was performed using KOD polymerase (Novagen). This strategy generates a construct with the restriction sites *NcoI* and *NotI* at the 5' and 3' ends, respectively. The PCR product was then ligated into the dephosphorylated pET28b(+) vector digested with *NcoI* and *NotI*. The gene coding for *pgsA* was amplified from the *E. coli* MG1655 strain, by PCR, using primers 10 and 11 (Table 1) and Q5 polymerase (Biolabs, Evry, France). The fragment generated, containing a *PciI* and a *NotI* restriction site at the 5' and 3' ends, respectively, was further ligated into the pET28b(+) plasmid digested by *NcoI* and *NotI*. Both constructs were verified by sequencing, as described above.

## Expression

Plasmids were transferred either into SM2-1 and MN7 strains previously transformed with the pYAT7 vector or directly into the BL21(DE3) strain. All transformations were carried out by

electroporation using a Bio-Rad Micropulser. The resulting transformants were grown on LB plates with appropriate antibiotics at 37°C for the BL21(DE3) strain or at 30°C for the others.

For protein expressions, clones were grown overnight in LB medium, containing appropriate antibiotics, and at the temperature described previously. Cultures were then diluted 10 times and grown until the OD<sub>600 nm</sub> reached 0.6–0.8. Induction, for 5 h, was initiated by the addition of 1 mM IPTG.

For SDS-PAGE analysis, the conditions were identical except that IPTG was added for 3 h at 30°C. The expression level was tested by loading the total proteins extracted from an equivalent of 100 µL of culture at an OD<sub>600 nm</sub> of 1.

To prepare cell extracts, containing soluble AtCGI-58, MmCGI-58 or plsC, 100 mL of culture was harvested by centrifugation. The pellet was then incubated with 1 mg/mL of lysozyme, for 30 min at 4°C, in lysis buffer containing 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 300 mM NaCl at pH 7.4. Cells were disrupted by probe sonication. Cell debris were then removed, by centrifugation at 10 000 x g for 20 min, and the soluble fraction was used for enzymatic tests or purification.

## Purification

The soluble fraction, obtained as described above, was incubated with TALON<sup>®</sup> Metal Affinity Resin (Clontech). An extract containing AtCGI-58 was incubated, for 3 h at 4°C, in a buffer composed of 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, and 20 mM imidazole at pH 7.4. An extract containing MmCGI-58 was incubated overnight at 4°C in a buffer consisting of 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 30 mM imidazole, 1 mM DTT and 10% glycerol at pH 7.5 (Prof. Bra-saemle, Rutgers, The State University of New Jersey, USA; personal communication). Resin was then recovered, by centrifugation, and washed with the same buffers as described previously except that the imidazole concentration was increased to 25 mM for AtCGI-58 and to 100 mM for MmCGI-58 purification. Any bound proteins were then eluted with the same buffers, containing 250 mM imidazole, and desalted on PD-10 columns equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 8, plus 10% (v/v) glycerol. The concentration of purified protein was estimated by measuring absorbance at 280 nm using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The authenticity of MmCGI-58 was checked by mass spectrometry following tryptic digestion (Centre d'Analyses Protéomiques IMM-CNRS, Marseille, France). For plant CGI-58, proteins were transferred, after SDS-PAGE, onto nitrocellulose membranes and the presence of the N-terminal His-tag was verified by development with a monoclonal anti-polyHistidine-peroxidase antibody.

## Mutagenesis

AtCGI-58 mutations were generated using the GeneArt<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis PLUS system from Invitrogen. The cDNA coding for the truncated version of AtCGI-58 and cloned into the pET28b vector was used as a template. Primers, described in [Table 1](#), were used to substitute H379 and D384 with alanyl residues, and S199 in the lipase motif of AtCGI-58 was replaced by an asparaginy residue, as found in MmCGI-58.

## Lipid extraction

Total lipids were extracted using the method of Bligh and Dyer, as modified by Ames [\[26,27\]](#). *E. coli* cells were induced in 25 mL of culture, as previously described for protein expression except that induction was reduced to 4 hours. Cells were then harvested with a 4 000 x g centrifugation for 10 min, the pellet was re-suspended in 0.8 mL of PBS, and 2 mL of methanol and 1 mL of chloroform were added with thorough mixing. After 1 h at room temperature, 1 mL of chloroform and 1 mL of PBS solution were added and then the phases were thoroughly mixed.

After a brief low-speed centrifugation, the resulting organic phase was carefully removed, dried under N<sub>2</sub>, re-suspended in a small volume of chloroform and then analyzed for individual phospholipids. Two-dimensional thin layer chromatography, on pre-coated TLC-sheets ALU-GRAM<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey Nagel), was used to separate the different lipids. For the first dimension, a solution of chloroform / methanol / water (65:25:4, v/v/v) was used and then a chloroform / methanol / acetic acid (65:25:10, v/v/v) solution was employed for the second dimension. After drying the plates, lipids were visualized by exposure to iodine vapor.

### Lipid quantification

PG and PE were quantified by LC/MS/MS. Total lipids extracted as mentioned previously, were re-suspended in 2.5 mL of methanol. An aliquot (200  $\mu$ L) of each sample was filtrated, dried under N<sub>2</sub>, re-suspended in 200  $\mu$ L of acetonitrile / methanol / chloroform (18:1:1, v/v/v) and then 10  $\mu$ L of this sample were injected for analysis. The LC system consists of two LC-30AD binary pumps, a SIL-30AC autosampler and a CTO-20AC column oven (Shimadzu). Samples were separated on a CORTECS HILIC column 2.7 $\mu$ m 4.6x150 mm from Waters.

The gradient elution used eluents A and B, where A was 95/5 acetonitrile/water with 10 mM ammonium formate and B was 50/50 acetonitrile/water with 10 mM ammonium formate. The column was equilibrated for 2 min with 0% of B prior to injection of the sample. The percentage of B was held constant for 2 min and it was then linearly increased from 0 to 50% over a period of 8 min. The flow rate was set to 0.5 mL/min and the column temperature to 30°C. The QTRAP 4500 mass spectrometer, equipped with a heated ESI source (ABSciex) was operated in positive mode. Nitrogen was used as both the sheath and the curtain gas and it was set to 20 and 40 psi, respectively. The sprayer voltage was set at 4500 V and the collision gas at medium. The vaporized temperature was set at 350°C.

For the neutral loss scan experiments, the MS/MS scan consists of a search for neutral loss of 189 Da for PG analysis, and 141 Da for PE. The mass range was from  $m/z$  600 to 1000 for PG and PE, and the scan rate was 1000 Da/s for each experiment. The declustering potential was set to 95, entrance potential to 10, collision energy to 37 and collision cell exit potential to 13 for all the experiments. The quantity of PG and PE was calculated based on a 28:0 PG and 36:2 PE standard curve, respectively.

### Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  S.D. Statistical significance was determined by the Student's unpaired t-test (two-tailed). Samples were considered to be significantly different for  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*), and  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## Results and Discussion

### Development of a new set of plasmids allowing *E. coli* expression of genes cloned into pET plasmids

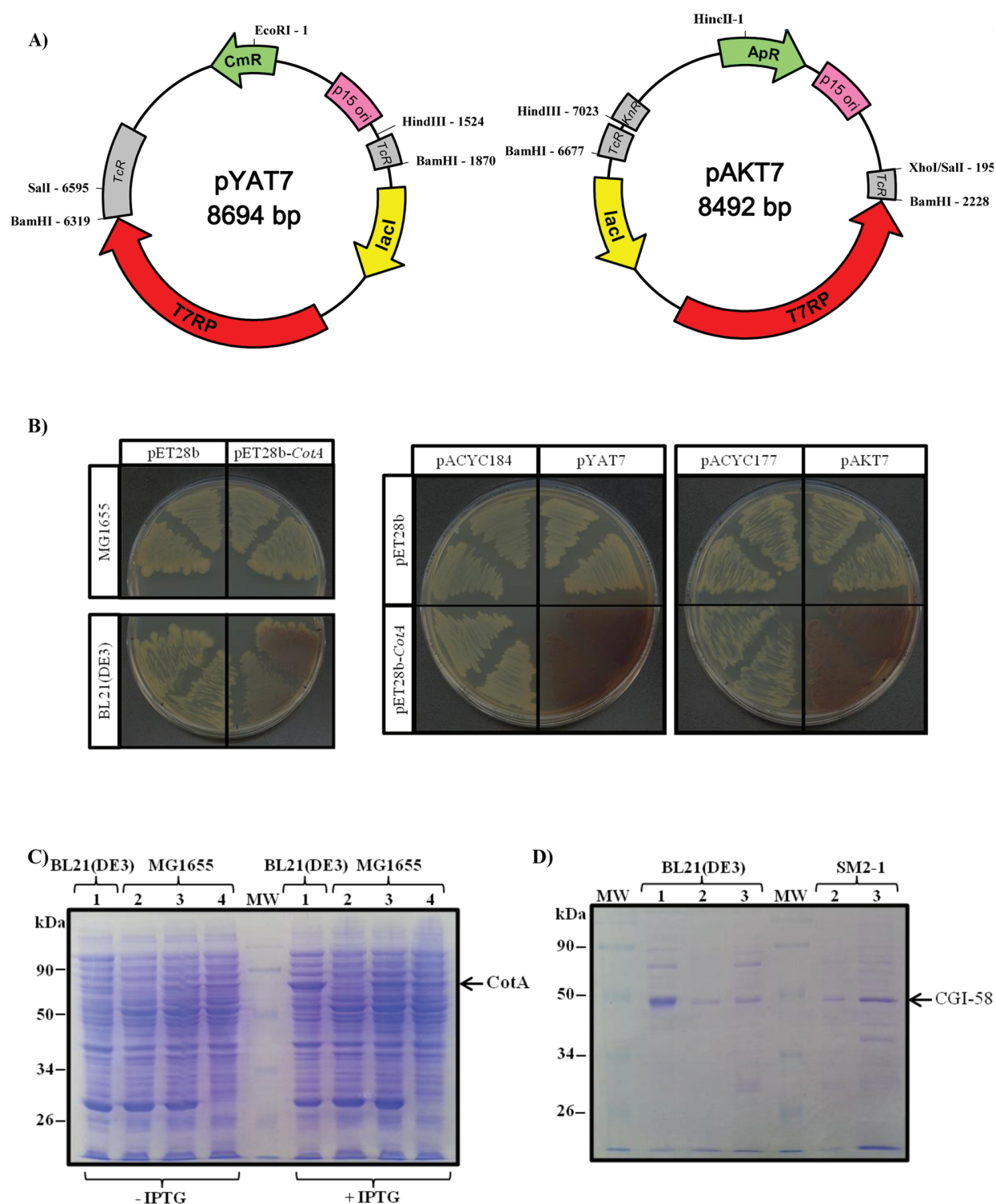
Constructs designed for protein overexpression in *E. coli* are frequently made into pET plasmids (Novagen), cloned 3' to the T7 phage promoter. These pET plasmids confer resistance to either kanamycin or ampicillin and have a pBM1 origin of replication. However, although these plasmids are useful in BL21(DE3) strains hosting chromosomal *T7RP*, they are of no use in other genetic backgrounds lacking *T7RP*. *T7RP* is indispensable for T7 promoter recognition, especially in *E. coli* mutants that are potent tools for complementation and for tests on proteins of unknown function. Expressing proteins in these valuable strains necessitates fastidious constructs and sub-cloning into other plasmids with a different promoter. In order to bypass these

problems, we decided to clone the *T7RP* into plasmids that had a compatible origin of replication, such as p15A and, at the same time, provide a different antibiotic resistance. Hence, we excised *lacI* and *T7RP* from the pAR1219 vector with BamHI and sub-cloned this fragment into the *tet* gene of a pACYC184 plasmid, previously digested with BamHI. In this way, we abolished the tetracycline resistance and then generated the pYAT7 plasmid with resistance to chloramphenicol only [Fig 1A]. *lacI* and *T7RP* were then excised from pYAT7, with SalI and HindIII, and the fragment was sub-cloned into the kanamycin resistance gene of the pACYC177 plasmid digested with XhoI and HindIII. *SalI* and *XhoI* sites have compatible ends and we then formed the pAKT7 plasmid, in this case conferring resistance to ampicillin [Fig 1A].

Recombinant laccase CotA has been previously shown to colorize the medium when successfully expressed in *E. coli* [28]. To prove the effectiveness of the two novel plasmids we had constructed, we transformed the MG1655 strain deficient in *T7RP* with one of these two plasmids and *CotA* was cloned into the pET28b. When transformed with pET28b-*CotA*, coloration due to ABTS oxidation by CotA was observed only in the BL21(DE3) strain containing a chromosomal *T7RP* [Fig 1B, left panel], and coloration was absent in MG1655, which does not contain *T7RP*. Coloration could be observed again when MG1655 was transformed with the construct pET28b-*CotA*, and either pYAT7 or pAKT7, but not with the native plasmids pACY177 or pACYC184 [Fig 1B, central and right panels]. This demonstrates that *T7RP* was both functionally expressed and allowed the expression of the recombinant protein whose corresponding gene was cloned into pET28b. To confirm that the level of expression was comparable to that found in BL21(DE3), total proteins from these transformants, grown with or without IPTG, were extracted and separated on SDS-PAGE [Fig 1C, left part]. As expected, the expression of recombinant CotA (theoretical molecular weight 58.5 kDa) was shown to be IPTG dependent and its expression level was quite similar, though slightly lower, in the common strain MG1655, transformed with either pYAT7 or pAKT7, compared to commercial BL21(DE3). Both plasmids could now be used in any strain deficient in *T7RP* in order to express *in vivo* genes cloned under the T7 promoter. They would be powerful tools for overexpressing recombinant proteins and to test for functional complementation with the same construct cloned into pET plasmids.

A comparison of plant and mammalian CGI-58 primary sequences reveals that they differ, in particular with regard to their N-terminal regions, as plant CGI-58 typically has an extension of about thirty residues. We searched for a CGI-58 homolog from different plant species of all taxa, from Mosses through to Eudicots. It was quite remarkable that the sequence homology begins 50 residues after the first methionine, suggesting divergent evolution of the N-terminal region and a strong conservation of the central and C-terminal parts [S1 Fig]. Bioinformatic software, such as TargetP [29], projects a transit peptide, either chloroplastic or mitochondrial, for CGI-58 for 24 out of the 28 plant sequences examined. Admittedly, plant CGI-58 was described as being cytosolic [4], but it was also found on the surface of peroxisomes [8]. Consequently, to avoid a probable misfolding of the protein expressed in *E. coli* due to a potential uncleaved transit or targeting peptide, we decided to test two versions of the *Ara-bidopsis* protein: full-length and one truncated at position 43.

We expressed the mouse CGI-58, plus the truncated and the full-length versions of CGI-58 from *A. thaliana*, in either BL21(DE3) or SM2-1 strains, the latter being deficient in *T7RP*, but previously transformed with a pYAT7 plasmid. Recombinant proteins were purified under native conditions according to published [18] and unpublished (Prof. Brasaemle, personal communication) protocols for mouse CGI-58 and an optimized protocol for plant CGI-58 (this study). Fractions were considerably enriched in target proteins, compared to crude extracts, and we were able to purify enough recombinant plant protein due to the expression capacity of the pYAT7 vector (24 to 36 micrograms of protein were purified per liter of culture). After SDS-PAGE, the fractions appeared to be enriched principally in the targeted protein [Fig 1D].



**Fig 1. A new set of plasmids containing *T7* RNA polymerase and with a replication origin compatible with the pET plasmid series, allowing expression and purification of recombinant proteins in *E. coli*.** A) Maps of vectors pYAT7 and pAKT7 containing *T7* RNA polymerase cloned into plasmids harboring the p15A origin of replication. Left panel: pYAT7 plasmid with *T7RP* cloned into the *Bam*HI site of the pACYC184 backbone, thus conferring resistance to chloramphenicol. Right panel: pAKT7 plasmid with *T7RP* cloned into the *Hind*III-*Sall* sites of the pACYC177 backbone, thus conferring resistance to ampicillin. Active and inactive antibiotic resistance genes are shown in green and in grey, respectively. Remarkable restriction sites



are shown. B) Functional use of pYAT7 and pAKT7 plasmids for expressing the recombinant CotA protein in MG1655, a T7RP deficient *E. coli* strain. Left panel: coloration due to ABTS oxidation in different *E. coli* genetic backgrounds necessitates both the presence of CotA and T7RP. MG1655 or BL21(DE3) strains were either transformed with void pET28b or with pET28b-CotA. Central and right panels: functional expression of CotA in MG1655 strain transformed with either pYAT7, pAKT7 plasmids or native pACYC184 or pACYC177 plasmids. LB plates contain 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, 1 mM ABTS and 1  $\mu$ M IPTG. All pictures were taken 3 days after streaking. C) Functional expression of CotA cloned into pYAT7 and pAKT7 plasmids with analysis by SDS-PAGE of total proteins extracted from the recombinant strain. Extracts were analyzed before or after a 3 h induction with IPTG. Lane 1: strain BL21(DE3) transformed with pET28b-CotA. Lane 2 and 3: strain MG1655 transformed with pYAT7 and either void plasmid (lane 2) or pET28b-CotA (lane 3). Lane 4: strain MG1655 transformed with pAKT7 and pET28b-CotA. The expected size of CotA (58.5 kDa) is indicated. D) Analysis by SDS-PAGE of purified CGI-58, from plant or mouse, expressed either in BL21(DE3) strain or SM2-1 and transformed with pYAT7. 5  $\mu$ g of recombinant MmCGI-58 and 2  $\mu$ g of recombinant plant CGI-58 were loaded onto each lane. Lane 1: MmCGI-58 (42.0 kDa), Lane 2: truncated version of AtCGI-58 (44.5 kDa), Lane 3: full-length version of AtCGI-58 (47.8 kDa). The authenticity of purified recombinant MmCGI-58 was verified by mass spectrometry after tryptic digestion, and for recombinant plant CGI-58 a Western-blot with monoclonal Anti-polyHistidine antibody was performed.

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g001

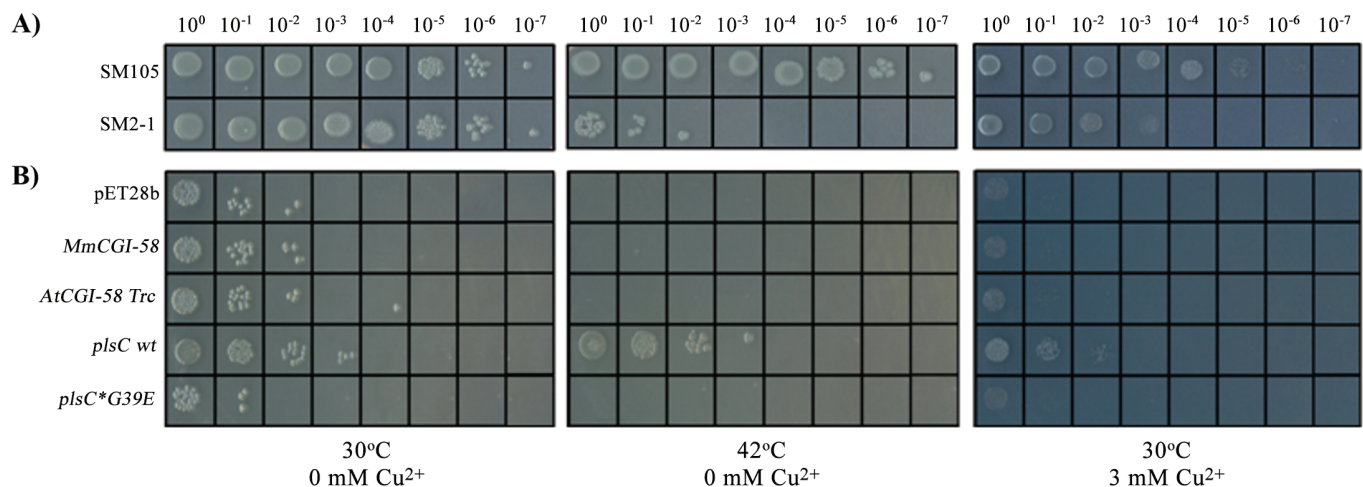
## Reassessing the phosphatidic acid synthase activity of recombinant plant CGI-58

Like the mammalian protein, recombinant plant CGI-58 has been previously described as catalyzing an LPAAT reaction. However, activity of the mammalian protein was recently shown to be due to an *E. coli* contaminant that co-purified with the protein [18]. In order to reevaluate the plant enzymatic activity, we tried to complement the SM2-1 strain deficient in LPAAT activity as a result of the *plsC* mutation. Compared to the wild-type strain SM105, this *plsC* mutant is unable to grow at 42°C [Fig 2A]. Complementing this strain with an enzyme catalyzing the synthesis of PA restores growth at this permissive temperature [30,31,32,33]. We co-transformed CGI-58 constructs, cloned into the pET28b vector, with the pYAT7 plasmid in the SM2-1 strain and then performed a serial dilution of the cultures. The void plasmid was used as a first negative control. As a positive control, we cloned *plsC* from BL21(DE3) and as a second negative control we used *plsC*\*G39E from SM2-1. This mutated gene coding for a G39E variant of *plsC* is responsible for the temperature sensitivity observed at 42°C [34]. The expression of different CGI-58 constructs did not restore growth at 42°C in the way that the expression of authentic *plsC* did, whereas expression of the *plsC* variant G39E showed no difference compared to the void control [Fig 2B]. Clones expressing AtCGI-58 FL behaved in the same way as those transformed with the truncated version of the protein (data not shown). This demonstrates that an active LPAAT, such as *plsC*, can be detected in this expression system and that strains transformed with different CGI-58s behave as negative controls.

CGI-58 was previously identified by its homology with yeast ICT1 (Increased Copper Tolerance 1) [5]. Since an *ict1* mutation causes copper sensitivity [6], one could hypothesize that CGI-58 proteins participate in copper tolerance or detoxification too. We first decided to examine the sensitivity of strain SM2-1 to copper. Interestingly, this strain deficient in LPAAT activity is considerably more sensitive to copper than the SM105 wild-type strain, proving that *plsC* confers an advantage in regards to copper toxicity and that lipid composition is related to copper permeability [Fig 2A]. When different CGI-58 constructs were expressed in the presence of 3 mM of copper, no difference in growth could be observed compared to the negative controls under these conditions. AtCGI-58 FL and murine CGI-58 with 6 (data not shown) or 12 His-tag behaved in the same manner.

However, a clone expressing *plsC* was more resistant to copper than the control and a clone expressing the mutated version of *plsC* was comparable in behavior to the void control [Fig 2B]. Under these conditions, no complementation of this strain could be observed with different CGI-58 constructs, especially with those of plants. The same results were obtained when transformants were grown in liquid medium with 50  $\mu$ M of copper (data not shown). An involvement of PA synthesis has already been described in vancomycin resistance in *E. coli* [35], but this is the first report, to our knowledge, of a direct link between PA synthesis and copper sensitivity.



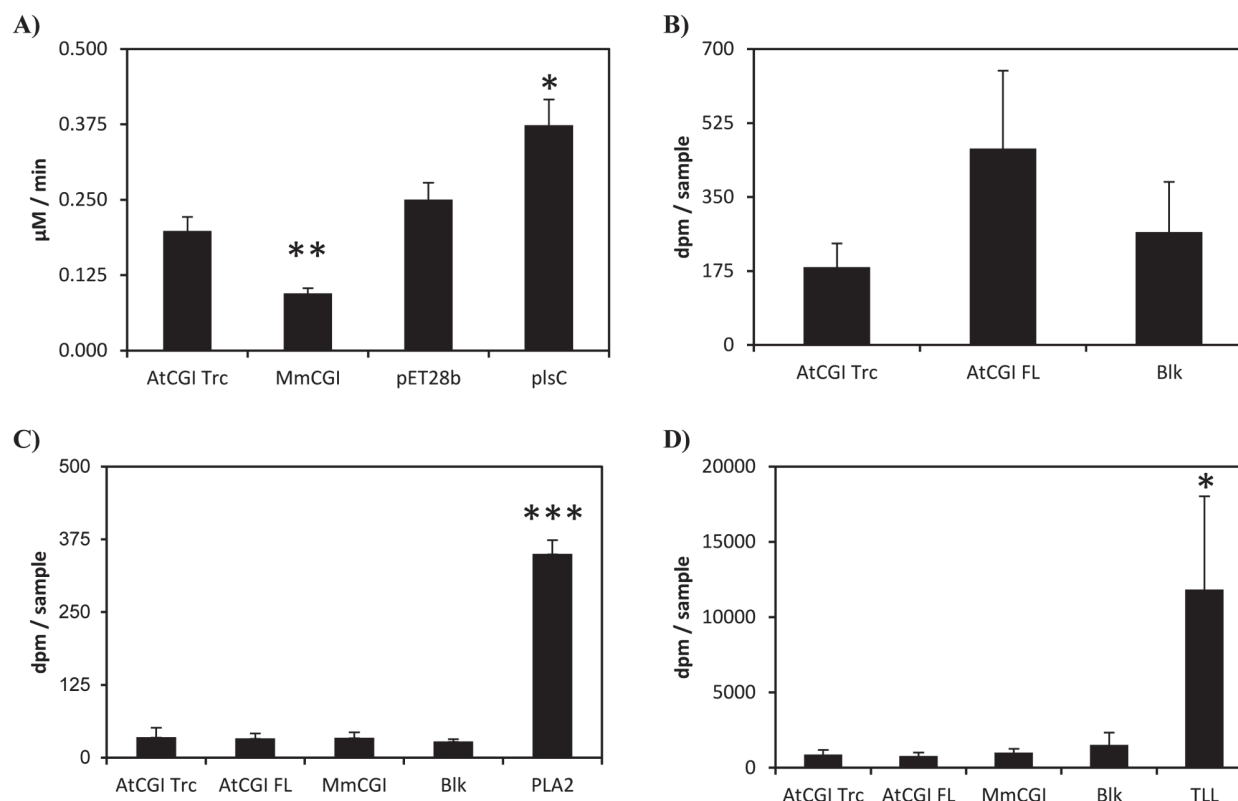


**Fig 2. Absence of lysphosphatidic acid acylCoA acyltransferase activity of plant CGI-58 protein shown by functional complementation.** A) Phenotype of SM2-1 and SM105 strains, grown at 30 or 42°C in the presence or absence of 3 mM of copper sulfate after serial dilution. B) Serial dilutions of the SM2-1 strain containing the pYAT7 plasmid and transformed with *CGI-58* constructs or controls: void pET28b vector, *MmCGI-58*, *AtCGI-58 Trc*, *plsC wt*, or *plsC\*G39E*. Liquid cultures were incubated for 4 hours with 100  $\mu$ M IPTG prior to dilution and plating. LB plates contained, in addition to antibiotics, 100  $\mu$ M IPTG. All pictures were taken 2 days after plating.

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g002

Since CGI-58 is described as being located in the cytosol [4] and *plsC* has been shown to be membrane-bound by the presence of a putative anchor in its N-terminal region [36], allowing for co-localization of the protein and its substrates, a chimera was made of the first 40 amino acids of *plsC* fused to the N-terminal region of mouse CGI-58. No difference under the temperature and copper toxicity conditions described above was observed compared to native CGI-58 and negative controls (data not shown). This corroborates the results obtained by other researchers [18]. We observed, after SDS-PAGE analysis of proteins purified from membrane fractions, that mouse CGI-58 is already partially membrane-bound in *E. coli* and that adding the first 40 amino acids of *plsC* leads to a similar amount of mouse CGI-58 protein in the membrane fraction (data not shown).

Considering the possibility that the plant enzyme and its substrates are not close enough together, *in vivo*, to permit a catalytic reaction, we next tried to measure *in vitro* LPAAT activity with a purified protein. Our first attempts to measure the activity, as described previously [12], were unsuccessful. As detailed by Ghosh *et al.*, recombinant plant CGI-58 was purified from inclusion bodies, under denaturing conditions with 6 M urea, and tested without any proper refolding step, but it is possible that the refolding was immediate when the protein was mixed in the reaction buffer. Consequently, we tried to measure LPAAT activity using recombinant plant CGI-58 purified under native conditions from BL21(DE3) [Fig 1D] and we were able to detect, by LC-MS, a weak PA synthesis over time. However, at the same time as we were performing this experiment, McMahon *et al.* showed that the previously described LPAAT activity for mouse CGI-58 was emanating, in fact, from *E. coli* *plsC* that co-purifies with CGI-58 [18]. We decided to continue with the expression of CGI-58 and *plsC* in SM2-1 to minimize proven contamination during purification from *plsC*. We tested crude extracts and proteins purified under native conditions for LPAAT activity. Although an increase in activity was measured in a crude extract from SM2-1 cells transformed with *plsC*, no increase in LPAAT activity was observed in any other samples tested [Fig 3A]. The activity in samples expressing recombinant plant CGI-58 was the same as that of the control and, notably, no activity could be detected with recombinant plant purified protein compared to the mock sample [Fig 3B].



**Fig 3. Reassessing the potential activities of recombinant plant CGI-58 using enzymatic tests.** A) Measurement of PA formation, through LPAAT activity, using 5  $\mu$ g of protein from a crude extract of SM2-1 cells transformed either with the void pET28b vector, or the truncated version of *AtCGI-58*, or *MmCGI-58* or *plsC*. Activities were corrected from the blank values obtained with samples tested in the absence of protein; blank values represent less than 10% of the dpm counted with other samples. Values  $\pm$  SD are the mean of three independent measurements. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 (vs pET28b). The experiment was repeated with similar results. B) Measurement of total dpm found in the PA fraction after TLC separation with purified recombinant plant CGI-58. LPAAT activity was tested with samples incubated for 10 min in the presence of 1  $\mu$ g of a purified full-length or truncated version of *AtCGI-58* expressed in the SM2-1 strain. Blanks (Blk) were prepared with no protein incubation. Values  $\pm$  SD are the mean of three independent measures. The experiment was repeated with similar results. C) Measurement of the phospholipase activity of purified recombinant plant CGI-58. D) Measurement of the triglyceride lipase activity of purified recombinant plant CGI-58. For both figures, the total dpm counted in the free fatty acid fraction after TLC separation is shown. Samples were incubated for 40 min in the presence of 1  $\mu$ g of a purified full-length or truncated version of *AtCGI-58* expressed in the SM2-1 strain. Porcine pancreatic phospholipase  $A_2$  (1 ng) and triglyceride lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (100 ng) were used as positive controls. Blanks (Blk) were prepared with no protein incubation. Values  $\pm$  SD are the mean of three independent measures. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 (vs blank). The experiment was repeated with similar results.

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g003

Interestingly, activity in the crude extracts of samples expressing MmCGI-58 was consistently and repeatedly half of that observed in the control, suggesting that MmCGI-58 could modulate *plsC* activity directly or indirectly and it could have an effect on lipid metabolism in *E. coli*.

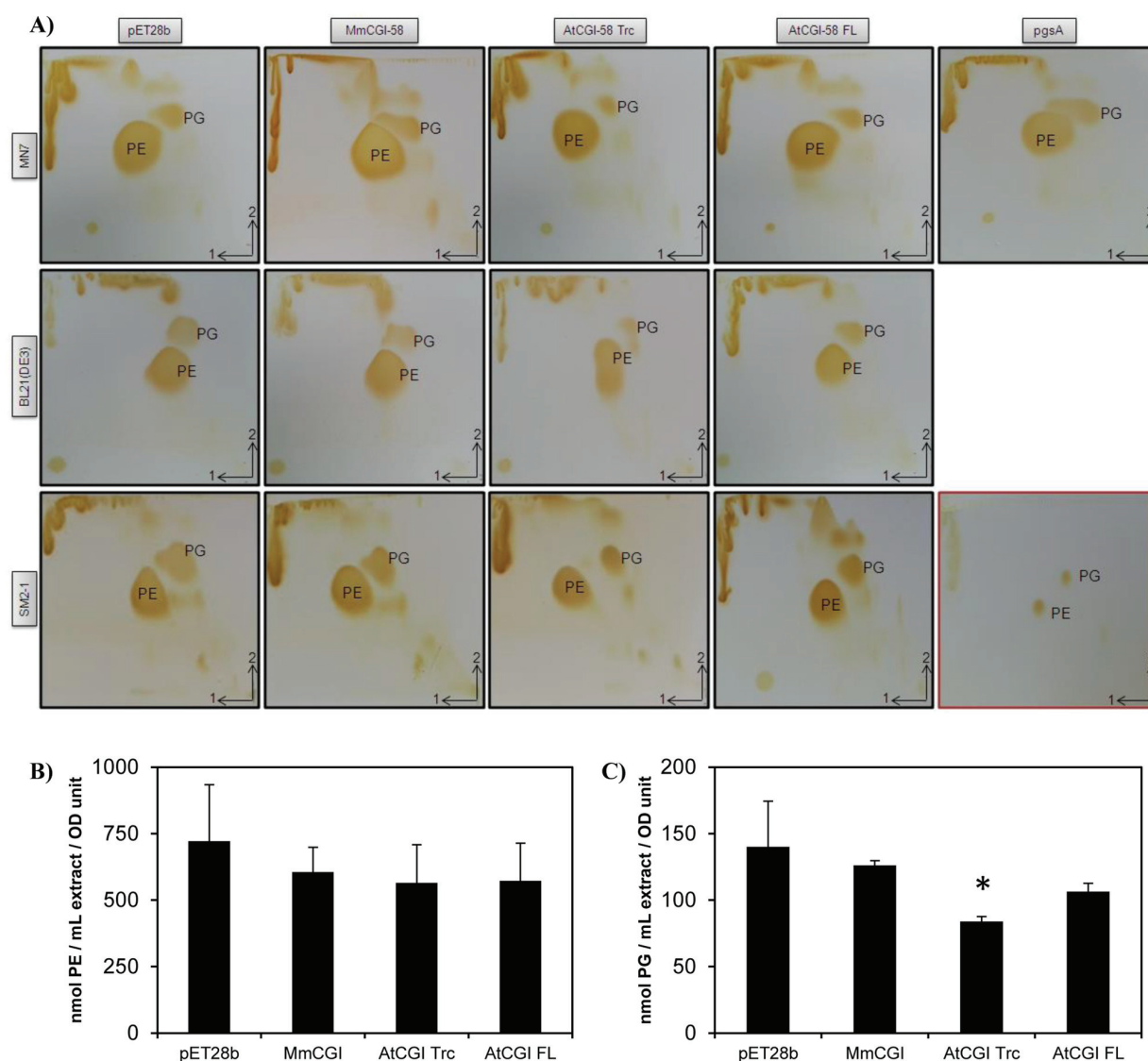
We tested the phospholipase and TAG lipase activities of recombinant plant CGI-58 purified under native conditions with porcine pancreatic PLA<sub>2</sub> and TLL, two well-known lipolytic enzymes, as positive controls for each activity. Although fatty acids were freed from PC and TAG by PLA<sub>2</sub> and TLL, respectively, no free fatty acids could be detected as a result of recombinant plant CGI-58 incubation, as shown in Fig 3C and 3D. No differences were observed between all the samples tested and, in particular, the radioactivity measured with purified recombinant plant CGI-58 was the same as the background measured in the blank prepared without any enzyme. Whilst the LPAAT activity, previously described for recombinant plant CGI-58 [12], may have resulted from *plsC* contamination, the absence of phospholipase and TAG lipase activities with our recombinant plant CGI-58 proteins, purified under native

conditions in our study, is puzzling. These enzymatic activities have been described [37,38], or suspected [39], in *E. coli*, but, to our knowledge, no protein has been identified or characterized so far, rendering the hypothesis of another contamination improbable but still possible. However, recombinant plant CGI-58 was previously purified from urea-solubilized inclusion bodies [12], therefore it is still possible that the refolding step in an urea-free buffer leads to conformational changes affecting the enzymatic properties of the protein. More probably, traces of urea resulting from purification under denaturing conditions may have increased these weak enzymatic activities, dilute denaturants, such as urea, being well-known activators of catalytic activities [40,41,42,43].

### Assaying the phosphatidylglycerol synthase activity of recombinant plant CGI-58

Since it has recently been suggested that mammalian CGI-58 catalyzes PG synthesis [19], we decided to test the activity of plant and mouse CGI-58 in *E. coli* with functional complementation. We used the MN7 strain, deficient in PG synthesis, where there is a mutation in *pgsA*, which provokes a phenotype with temperature-sensitivity that can be alleviated by expressing a phosphatidylglycerate synthase [20,44]. Even though *pgsA* encodes a CDPdiacylglycerol: sn-glycerol-3-phosphate phosphatidyltransferase and not a lysophosphatidylglycerol acylCoA acyltransferase, lysoPG is still found in *E. coli* [45,46]. Consequently, a lysoPG acyltransferase, or any enzyme catalyzing the formation of PG from intermediates present in *E. coli*, may overcome this lethal phenotype. When expressed in the MN7 strain with the pYAT7 plasmid, which allows the expression of genes cloned into the pET28b plasmid, none of the clones expressing the different CGI-58 constructs could grow at 42°C (data not shown). This demonstrates that, under these conditions, CGI-58s seem not to be involved in PG synthesis *in vivo*.

However, expressing *pgsA*, cloned into the pET28 plasmid in the MN7 strain, did not give a clear positive control at 42°C, potentially due to the toxicity of PGSA expression or activity that we observed at 30°C with this particular clone. In order to detect a putative PG synthesis in all the clones tested, we decided to analyze the lipid content of this PG-deficient strain using 2-D TLC [47]. Compared to the negative control transformed with the void vector, the PG spot was only slightly darker after diiodine detection of the lipids extracted from the strain transformed with *pgsA* [Fig 4A]. This might explain why the results of the complementation were not definitive under our conditions. One obvious explanation is the probable toxicity due to *pgsA* overexpression—it is difficult to propagate this particular clone because it has a short survival period on plates after transformation. Surprisingly, although the amount of PG appeared to be the same in the clone transformed with mouse CGI-58, compared to the control, this amount was clearly lower in the clone transformed with the full-length version of plant CGI-58, and considerably lower in the clone transformed with the truncated version. MN7 was shown to have a very low amount of PG [20] and, to avoid a possible artifact in this particular strain, we re-examined the phospholipid composition, especially the amount of PG, in all the strains previously used to characterize CGI-58. Surprisingly, the results were similar in the wild-type strain, BL21(DE3), and in another phospholipid synthesis mutant, SM2-1 [Fig 4A]. In both strains there was no visual difference in the clones expressing mouse CGI-58 compared to the control; there was a lower amount of PG when the full-length version of *Arabidopsis* CGI-58 was expressed in BL21(DE3); and, again, significantly less PG in both strains when the truncated version was used [Fig 4A]. We hypothesized that the truncated version has a more dramatic effect because of the removal of the putative N-terminal peptide. Since the effects of recombinant plant CGI-58 expression appeared more dramatic in the SM2-1 strain, we decided to quantify the phospholipid content in this particular strain by LC/MS/MS. Although the



**Fig 4. Analysis of phospholipids extracted from strains transformed with different versions of CGI-58.** Strain MN7 deficient in PG synthesis [20], wt strain BL21(DE3) and strain SM2-1 deficient in PA synthesis [21] were all transformed with either the void plasmid, the CGI-58 from mouse, or the full-length or truncated version from plant CGI-58. *pgsA* was also used as a positive control to restore PG synthesis in MN7. MN7 and SM2-1 strains had been previously transformed with pYAT7. A) TLC analysis of total lipids extracted after a 4 h-induction of transformants by 1 mM IPTG, then separated by 2-D TLC with, first, chloroform/methanol/water (65:25:4, v/v/v), and then with chloroform/methanol/acetic acid (65:25:10, v/v/v). After drying the plates, the lipids were visualized by exposure to diiodine vapor. TLC with authentic PE and PG standards is shown in the bottom right-hand corner (red frame). Each experiment was repeated at least thrice. B) Measurement of PE content of SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted as above and analyzed. The quantities of PE were calculated based on a 36:2 PE standard curve and normalized with the OD<sub>600nm</sub> values of the liquid cultures after a 4 h-induction by IPTG. Values  $\pm$  SD are the mean of three independent clones. C) PG content in SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted as above and analyzed. The quantities of PG were calculated based on a 28:0 PG standard curve and normalized with the OD values as above. Values  $\pm$  SD are the mean of three independent clones. \*  $P < 0.05$ , (vs pET28b).

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g004

content of PE was not significantly different between all the clones tested [Fig 4B], the content of PG was reduced by 40% in clones expressing the truncated version of AtCGI-58, compared to the control [Fig 4C], confirming the results obtained by TLC analysis [Fig 4A].

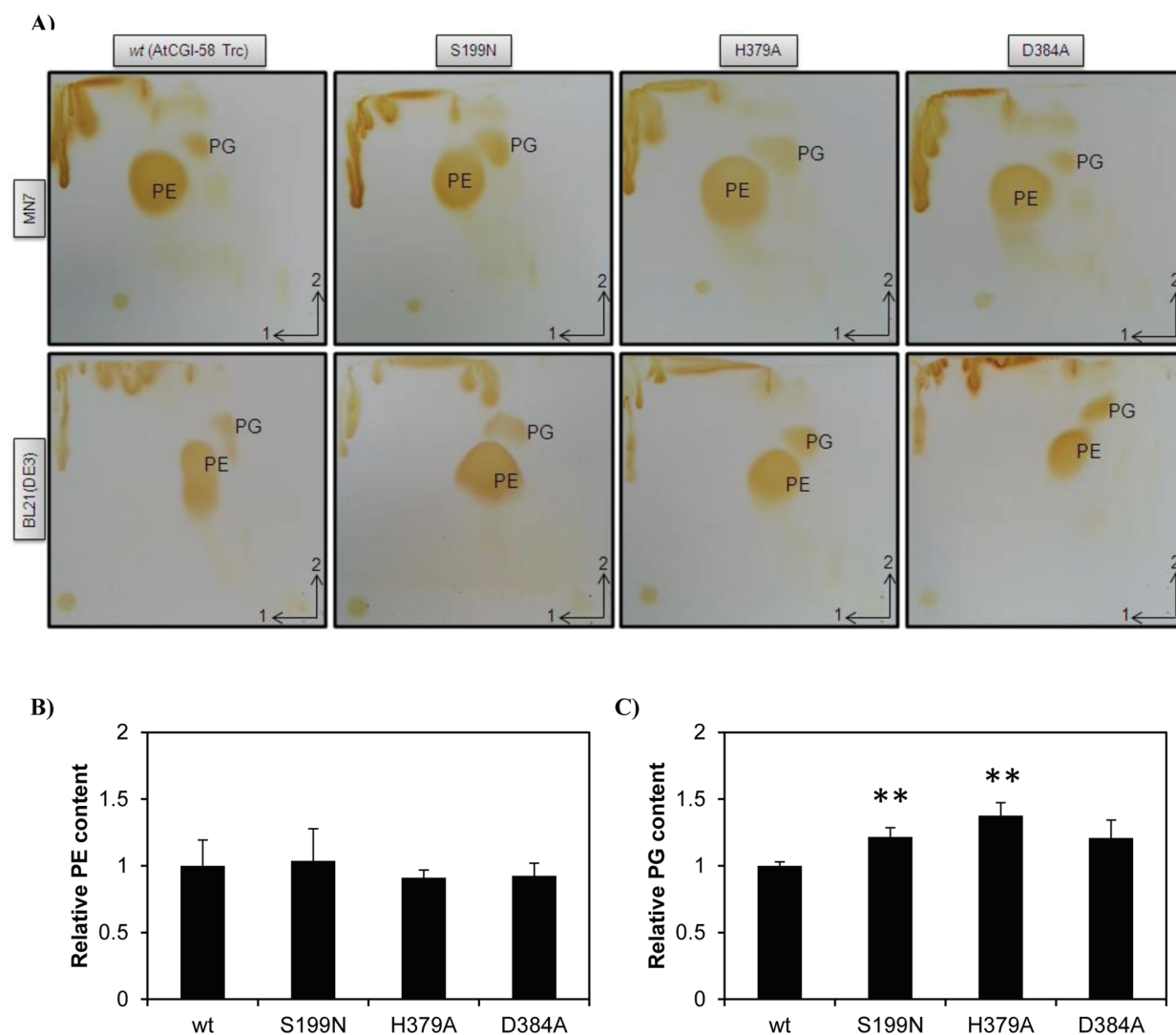
There could be several reasons for the decrease in PG content: either PG or the precursors of PG synthesis [48], such as CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate, are used as a substrate

by plant CGI-58 to form another undetected lipid or, alternatively, CGI-58 may have a regulatory role in phospholipid synthesis. To test the hypothesis that PG could be a substrate for plant CGI-58, we synthesized labeled PG, from [ $^{14}\text{C}$ ]-PC, using the phospholipase D-catalyzed transphosphatidylolation reaction of [ $^{14}\text{C}$ ]-PC and glycerol. However, under the conditions used, neither the incubation of crude extract from the BL21(DE3) strain expressing plant CGI-58 nor the incubation of purified truncated protein in the presence of [ $^{14}\text{C}$ ]-PG led to PG hydrolysis (data not shown), suggesting that either an acceptor of the PG moiety was missing in the enzymatic test or that PG is not a real substrate of recombinant plant CGI-58. The observation that CGI-58 may have a role in determining PG content or in homeostasis has already been described in the literature concerning mouse CGI-58 [49]. When CGI-58 expression was inhibited in adult mice by antisense oligonucleotides, there was a 10-fold increase in their hepatic PG level. Since mouse CGI-58 lacks the putative catalytic seryl residue, we could hypothesize that the effect of CGI-58 on the PG level may not be directly linked to its hydrolytic abilities, but rather to a signaling function. The fact that the amount of PG is affected by the expression of CGI-58 has already been observed *in planta* as well. An analysis of lipid profiles in plants mutated for CGI-58 showed that PG levels increased compared to the wild-type, whereas the amount of other major plant phospholipids (PC, PE, phosphatidylinositol and phosphatidylserine) was unchanged [4]. It is always possible that mammalian CGI-58s are not functional in *E. coli*, compared to eukaryotic expression systems and, hence, no effect is detected in this prokaryotic system. It would be interesting to measure all the enzymatic activities involved in phospholipid metabolism in *E. coli* in order to detect any changes due to CGI-58 expression and to restrict the metabolic route affected by its expression.

### Using a PG phenotype to test for the importance of catalytic residues

Interestingly, the nature of the artefactual LPAAT activity of mouse CGI-58 was proven when the activity of the wild-type protein was discovered to be equivalent to that of recombinant CGI-58 with mutations in putative catalytic residues [18]. In order to prove that a catalytic activity, rather than a putative regulatory bias of plant CGI-58, was involved in the decrease of PG in *E. coli*, we decided to analyze the effect of a mutation of the seryl residue at position 199, using the difference in PG levels in transformants to screen other putative catalytic residues of recombinant plant CGI-58 protein. The seryl residue at position 199 is replaced in mammals by an asparaginylnyl and this residue is thought to be involved in the catalytic reaction [12,50]. In addition, histidyl 379 and aspartyl 384 have been identified as belonging to the HX<sub>4</sub>D motif, which is indispensable for glycerolipid acyltransferase catalysis [51], and a particular 3-D modeling of murine CGI-58 has placed these 3 amino acids in close proximity to one another [12,50]. In order to verify the importance of the residues in the catalytic reaction, we designed primers to change these three residues by site-directed mutagenesis in plant CGI-58 and, hence, we created S199N, D384A and H379A versions of the truncated plant CGI-58. Mutated versions of plant CGI-58 were then expressed with the pYAT7 plasmids in MN7, SM2-1 and BL21(DE3) strains. Lipids were again extracted and separated by 2D-TLC for the MN7 and BL21(DE3) strains [Fig 5A]. Mutations S199N and H379A led to a visual increase of the PG level in both strains, demonstrating that S199 and H379 residues are involved in the decrease of PG seen in strains transformed with the wild-type construct. The amount of PG in mutant D384 is quite similar to that found in the corresponding wild-types, suggesting that this residue is not involved in the catalytic reaction. Consequently, we decided to quantify the amount of phospholipids, by LC/MS/MS, in SM2-1 transformants where we had previously observed the more dramatic effects. Compared to the wild-type version of the truncated plant protein, no statistical difference in PE content could be observed among the different mutations [Fig 5B].





**Fig 5. Analysis of phospholipids extracted from strains transformed with mutated versions of plant CGI-58.** A) TLC analysis of total lipids extracted from strains MN7 and BL21(DE3). Lipids were extracted and separated as described in Fig 4. Experiments were carried out at the same time and under the same conditions and, for comparison, TLC pictures of wild-type AtCGI-58 Trc were duplicated from Fig 4. Each experiment was repeated at least twice. B) Comparison of the PE content of SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted and analyzed. The quantities of PE were calculated based on a 36:2 PE standard curve and normalized to the PE content of the wild-type (AtCGI-58 Trc). Values  $\pm$  SD are the mean of three independent clones. C) Comparison of the PG content of SM2-1 transformants determined by LC/MS/MS. Total lipids were extracted and analyzed. The quantities of PG were calculated based on a 28:0 PG standard curve and normalized to the PG content of the wild-type (AtCGI-58 Trc). Values  $\pm$  SD are the mean of three independent clones. \*\*  $P < 0.01$ , (vs wt).

doi:10.1371/journal.pone.0145806.g005

However, the PG content was significantly increased by 22 and 38% when the S199N and H379A versions of the protein were expressed respectively. The amount of PG was not statistically different from that of the wild-type when the D384A version was expressed. This D384 residue is not completely conserved among plant CGI-58s [S1 Fig] and it is sometimes replaced by Glutamyl, an alternate acidic residue, in *Theobroma cacao* and *Solanum lycopersicum*. It is still possible that another residue, such as D302 or D351 that is absolutely conserved in all plant CGI-58s [S1 Fig], could be the third member of the catalytic triad. We should point out that D351 has been identified [50] as the proposed catalytic residue in a 3D-modeling of



murine CGI-58. Moreover, another 3-D modeling of murine CGI-58 has placed the homolog of the D384 residue on the exterior surface of the protein rather than in the internal pocket [18]. As previously suspected, S199 is involved in the catalytic reaction. It is perhaps obvious that mammalian CGI-58 harboring an asparaginyl residue at the same position as the seryl residue plays no role in the decrease of PG, as shown in Fig 4, suggesting divergent roles for plant and mammalian CGI-58. Measuring the PG content could now be used as a screening method to establish which amino acid is important for the catalytic reactions involving plant CGI-58.

## Conclusion

Although their role in lipid metabolism is demonstrated again here, plant and mammalian CGI-58 seem to have different catalytic roles, at least in regards to their involvement in the decrease of PG levels in *E. coli*. The catalytic activity of plant CGI-58 is still to be elucidated although we have shown for the first time that the seryl residue at position 199 and the histidyl residue at position 379 are implicated in recombinant plant CGI-58 activity. There are also several lines of evidence indicating that its activity is closely related to PG metabolism. *In planta*, the amount of PG has been shown to increase if CGI-58 is mutated, and we show in this paper that the quantity of PG decreases in bacteria when the protein is overexpressed. Since PG is directly linked with cardiolipin synthesis, some alternative roles of plant CGI-58, involving either PG precursors or PG sequels, are currently being investigated.

## Supporting Information

**S1 Fig. Alignment of plant CGI-58s.** Sequences were retrieved from NCBI with the protein BLAST software, using *AtCGI-58* as bait, from Mosses through to Eudicot proteins. Alignment was performed with BioEdit software and the shading threshold was set to 75% identity. *Arabidopsis thaliana* At4g24160 was retrieved from a sequenced RAFL19-16-I19 clone and the *Physcomitrella patens* sequence was reconstructed from a sequencing of ESTs BY990945.1 and BJ940330.1. All the aforementioned clones were obtained from the Riken Institute [22,23]. Accession numbers are as following: *Camelina sativa* XP\_010439078.1, *Brassica rapa* XP\_009137743.1, *Populus trichocarpa* XP\_002307698.2, *Theobroma cacao* XP\_007017700.1, *Nelumbo nucifera* XP\_010271460.1, *Eucalyptus grandis* XP\_010061022.1, *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* XP\_009418733.1, *Sesamum indicum* XP\_011083599.1, *Solanum lycopersicum* XP\_004243145.1, *Nicotiana glauca* XP\_009794253.1, *Citrus sinensis* XP\_006473603.1, *Ricinus communis* XP\_002510485.1, *Phoenix dactylifera* XP\_008813831.1, *Medicago truncatula* XP\_003603733.1, *Glycine max* XP\_006577977.1, *Fragaria vesca* subsp. *vesca* XP\_004291822.1, *Malus domestica* XP\_008347352.1, *Prunus persica* XP\_007222711.1, *Picea glauca* BT117776.1, *Cucumis sativus* XP\_004152662.1, *Amborella trichopoda* XP\_006854859.1, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* XP\_010670751.1, *Zea mays* ACF79200.1, *Oryza sativa* Japonica Group NP\_001063697.2, *Brachypodium distachyon* XP\_003578450.1, *Sorghum bicolor* XP\_002460538.1. Positions of mutated residues S199, H379, and D384 of *Arabidopsis thaliana* CGI-58 are indicated by arrows. (TIF)

## Acknowledgments

We would like to thank Sébastien Guiral for his advice on plasmid drawing and microbiology techniques, and Antoine Escudier for his technical help. The authors thank Baptiste Fourmaux (Functional Lipidomic Platform, IMBL-INSA Lyon, Villeurbanne, France) for the phospholipid analysis. We are grateful to Lígia Martins for providing the *CotA* clone. Prof. Dawn

Brasaemle is gratefully acknowledged for providing the *MmCGI-58* clone and for her advice on mouse CGI-58 purification. The English revision by Valerie James and Julie Carter is also appreciated. Abdallah Khatib was supported by a grant from LASER (Lebanese Association for Scientific Research).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AK AA AN. Performed the experiments: AK YA AB AN. Analyzed the data: AK YA AB AA AN. Wrote the paper: AK AN.

## References

1. Lefevre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, et al. (2001) Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet* 69: 1002–1012. PMID: [11590543](#)
2. Xie M, Roy R (2015) The Causative Gene in Chanarin Dorfman Syndrome Regulates Lipid Droplet Homeostasis in *C. elegans*. *PLoS Genet* 11: e1005284. doi: [10.1371/journal.pgen.1005284](#) PMID: [26083785](#)
3. Serr J, Suh Y, Lee K (2011) Cloning of comparative gene identification-58 gene in avian species and investigation of its developmental and nutritional regulation in chicken adipose tissue. *J Anim Sci* 89: 3490–3500. doi: [10.2527/jas.2011-3897](#) PMID: [21642491](#)
4. James CN, Horn PJ, Case CR, Gidda SK, Zhang D, et al. (2010) Disruption of the Arabidopsis CGI-58 homologue produces Chanarin-Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17833–17838. doi: [10.1073/pnas.0911359107](#) PMID: [20876112](#)
5. Ghosh AK, Ramakrishnan G, Rajasekharan R (2008) YLR099C (ICT1) encodes a soluble Acyl-CoA-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic solvent stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283: 9768–9775. doi: [10.1074/jbc.M708418200](#) PMID: [18252723](#)
6. Entian KD, Schuster T, Hegemann JH, Becher D, Feldmann H, et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* 262: 683–702. PMID: [10628851](#)
7. Matsui K, Hirayama T, Kuroda K, Shirahige K, Ashikari T, et al. (2006) Screening for candidate genes involved in tolerance to organic solvents in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 75–79. PMID: [16493551](#)
8. Park S, Gidda SK, James CN, Horn PJ, Khoo N, et al. (2013) The alpha/beta hydrolase CGI-58 and peroxisomal transport protein PXA1 coregulate lipid homeostasis and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 1726–1739. doi: [10.1105/tpc.113.111898](#) PMID: [23667126](#)
9. Zolman BK, Silva ID, Bartel B (2001) The Arabidopsis *pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol* 127: 1266–1278. PMID: [11706205](#)
10. Park S, Keereetaweep J, James CN, Gidda SK, Chapman KD, et al. (2014) CGI-58, a key regulator of lipid homeostasis and signaling in plants, also regulates polyamine metabolism. *Plant Signal Behav* 9: e27723. PMID: [24492485](#)
11. Bayer A, Ma X, Stockigt J (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis—functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg Med Chem* 12: 2787–2795. PMID: [15110860](#)
12. Ghosh AK, Chauhan N, Rajakumari S, Daum G, Rajasekharan R (2009) At4g24160, a soluble acyl-coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Plant Physiol* 151: 869–881. doi: [10.1104/pp.109.144261](#) PMID: [19700561](#)
13. Schweiger M, Lass A, Zimmermann R, Eichmann TO, Zechner R (2009) Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E289–296. doi: [10.1152/ajpendo.00099.2009](#) PMID: [19401457](#)
14. Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T (2004) CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* 279: 30490–30497. PMID: [15136565](#)
15. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, et al. (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3: 309–319. PMID: [16679289](#)

16. Zierler KA, Jaeger D, Pollak NM, Eder S, Rechberger GN, et al. (2013) Functional cardiac lipolysis in mice critically depends on comparative gene identification-58. *J Biol Chem* 288: 9892–9904. doi: [10.1074/jbc.M112.420620](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420620) PMID: [23413028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23413028/)
17. Montero-Moran G, Caviglia JM, McMahon D, Rothenberg A, Subramanian V, et al. (2010) CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *J Lipid Res* 51: 709–719. doi: [10.1194/jlr.M001917](https://doi.org/10.1194/jlr.M001917) PMID: [19801371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19801371/)
18. McMahon D, Dinh A, Kurz D, Shah D, Han GS, et al. (2014) Comparative gene identification 58/alpha/beta hydrolase domain 5 lacks lysophosphatidic acid acyltransferase activity. *J Lipid Res* 55: 1750–1761. PMID: [24879803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24879803/)
19. Zhang J, Xu D, Nie J, Han R, Zhai Y, et al. (2014) Comparative gene identification-58 (CGI-58) promotes autophagy as a putative lysophosphatidylglycerol acyltransferase. *J Biol Chem* 289: 33044–33053. doi: [10.1074/jbc.M114.573857](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573857) PMID: [25315780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25315780/)
20. Nishijima M, Bulawa CE, Raetz CR (1981) Two interacting mutations causing temperature-sensitive phosphatidylglycerol synthesis in *Escherichia coli* membranes. *J Bacteriol* 145: 113–121. PMID: [7007311](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7007311/)
21. Coleman J (1990) Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *J Biol Chem* 265: 17215–17221. PMID: [2211622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2211622/)
22. Seki M, Carninci P, Nishiyama Y, Hayashizaki Y, Shinozaki K (1998) High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J* 15: 707–720. PMID: [9778851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9778851/)
23. Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Satou M, et al. (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296: 141–145. PMID: [11910074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11910074/)
24. Ben Ali Y, Carriere F, Abousalham A (2007) High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Protein Expr Purif* 51: 162–169. PMID: [16949301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16949301/)
25. Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2035–2039. PMID: [6371808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6371808/)
26. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917. PMID: [13671378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13671378/)
27. Ames GF (1968) Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J Bacteriol* 95: 833–843. PMID: [4868364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4868364/)
28. Beneyton T, Coldren F, Baret JC, Griffiths AD, Taly V (2014) CotA laccase: high-throughput manipulation and analysis of recombinant enzyme libraries expressed in *E. coli* using droplet-based microfluidics. *Analyst* 139: 3314–3323. doi: [10.1039/c4an00228h](https://doi.org/10.1039/c4an00228h) PMID: [24733162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24733162/)
29. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2: 953–971. PMID: [17446895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17446895/)
30. West J, Tompkins CK, Balantac N, Nudelman E, Meengs B, et al. (1997) Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA Cell Biol* 16: 691–701. PMID: [9212163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9212163/)
31. Brown AP, Carnaby S, Brough C, Brazier M, Slabas AR (2002) *Limnanthes douglasii* lysophosphatidic acid acyltransferases: immunological quantification, acyl selectivity and functional replacement of the *Escherichia coli* *plsC* gene. *Biochem J* 364: 795–805. PMID: [12049644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12049644/)
32. Cullinane M, Baysse C, Morrissey JP, O'Gara F (2005) Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151: 3071–3080. PMID: [16151217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16151217/)
33. Aygun-Sunar S, Bilaloglu R, Goldfine H, Daldal F (2007) *Rhodobacter capsulatus* OlsA is a bifunctional enzyme active in both ornithine lipid and phosphatidic acid biosynthesis. *J Bacteriol* 189: 8564–8574. PMID: [17921310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17921310/)
34. Morand LZ, Patil S, Quasney M, German JB (1998) Alteration of the fatty acid substrate specificity of lysophosphatidate acyltransferase by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 79–84. PMID: [9514885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9514885/)
35. Sutterlin HA, Zhang S, Silhavy TJ (2014) Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196: 3214–3220. doi: [10.1128/JB.01876-14](https://doi.org/10.1128/JB.01876-14) PMID: [24957626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24957626/)
36. Coleman J (1992) Characterization of the *Escherichia coli* gene for 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (*plsC*). *Mol Gen Genet* 232: 295–303. PMID: [1557036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1557036/)
37. Nantel G, Baraff G, Proulx P (1978) The lipase activity of a partially purified lipolytic enzyme of *Escherichia coli*. *Can J Biochem* 56: 324–328. PMID: [352486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/352486/)

38. Raetz CR (1978) Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 42: 614–659. PMID: [362151](#)
39. Willis LM, Whitfield C (2013) KpsC and KpsS are retaining 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferases involved in synthesis of bacterial capsules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20753–20758. doi: [10.1073/pnas.1312637110](#) PMID: [24302764](#)
40. France RM, Grossman SH (1996) Denaturation and urea gradient gel electrophoresis of arginine kinase: evidence for a collapsed-state conformation. *Arch Biochem Biophys* 326: 93–99. PMID: [8579378](#)
41. Beattie BK, Merrill AR (1996) In vitro enzyme activation and folded stability of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its C-terminal peptide. *Biochemistry* 35: 9042–9051. PMID: [8703907](#)
42. Ma YZ, Tsou CL (1991) Comparison of the activity and conformation changes of lactate dehydrogenase H4 during denaturation by guanidinium chloride. *Biochem J* 277 (Pt 1): 207–211. PMID: [1854334](#)
43. Pan JC, Yu Z, Su XY, Sun YQ, Rao XM, et al. (2004) Unassisted refolding of urea-denatured arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: evidence for two equilibrium intermediates in the refolding pathway. *Protein Sci* 13: 1892–1901. PMID: [15215531](#)
44. Dryden SC, Dowhan W (1996) Isolation and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* gene (*pgsA*) encoding phosphatidylglycerophosphate synthase. *J Bacteriol* 178: 1030–1038. PMID: [8576035](#)
45. Homma H, Nojima S (1982) Synthesis of various phospholipids from 2-acyl lysophospholipids by *Escherichia coli* extract. *J Biochem* 91: 1103–1110. PMID: [7047508](#)
46. Willis LM, Stupak J, Richards MR, Lowary TL, Li J, et al. (2013) Conserved glycolipid termini in capsular polysaccharides synthesized by ATP-binding cassette transporter-dependent pathways in Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7868–7873. doi: [10.1073/pnas.1222317110](#) PMID: [23610430](#)
47. Nishijima M, Raetz CR (1979) Membrane lipid biogenesis in *Escherichia coli*: identification of genetic loci for phosphatidylglycerophosphate synthetase and construction of mutants lacking phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 254: 7837–7844. PMID: [381294](#)
48. Lu YH, Guan Z, Zhao J, Raetz CR (2011) Three phosphatidylglycerol-phosphate phosphatases in the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 286: 5506–5518. doi: [10.1074/jbc.M110.199265](#) PMID: [21148555](#)
49. Brown JM, Betters JL, Lord C, Ma Y, Han X, et al. (2010) CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance. *J Lipid Res* 51: 3306–3315. doi: [10.1194/jlr.M010256](#) PMID: [20802159](#)
50. Oberer M, Boeszoermenyi A, Nagy HM, Zechner R (2011) Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58. *Curr Opin Lipidol* 22: 149–158. doi: [10.1097/MOL.0b013e328346230e](#) PMID: [21494142](#)
51. Heath RJ, Rock CO (1998) A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol* 180: 1425–1430. PMID: [9515909](#)

# Article 2 : Soumis

---

# A continuous spectrophotometric assay that distinguishes between phospholipase A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> activities

Meddy El Alaoui<sup>†,‡</sup>, Laurent Soulère<sup>‡</sup>, Alexandre Noiriel<sup>†</sup>, Florence Popowycz<sup>‡</sup>, Abdallah Khatib<sup>†</sup>, Yves Queneau<sup>‡</sup> and Abdelkarim Abousalham<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup> Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques, Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR 5246 CNRS, Université Lyon 1, Bât Raulin, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>‡</sup> Université de Lyon, INSA Lyon, ICBMS, Chimie Organique et Bioorganique, UMR 5246 CNRS, Université Lyon 1, INSA Lyon, CPE Lyon, Bâtiment Jules Verne, 20 Avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France.

\*To whom correspondence should be addressed: Abdelkarim Abousalham

Tel: +33 4 72 44 81 02

E-mail address: [abousalham@univ-lyon1.fr](mailto:abousalham@univ-lyon1.fr)



## Abstract

A new spectrophotometric assay was developed to measure continuously, and specifically, phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) or phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activities using synthetic glycerophosphatidylcholines (PC) containing  $\alpha$ -eleostearic acid, either at the *sn*-1 position (1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) or at the *sn*-2 position (1-octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine). The substrates were coated onto the wells of microtiter plates. A non-hydrolysable ether bond, with a non UV-absorbing alkyl chain, was introduced at the other *sn* position to prevent acyl chain migration during lipolysis. Upon enzyme action,  $\alpha$ -eleostearic acid is liberated and then solubilized into the micellar phase. The PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> activity was measured by the increase in absorbance, at 272 nm, due to the transition of  $\alpha$ -eleostearic acid from the adsorbed to the soluble state. These compounds differentiate, with excellent accuracy, between PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activity. Lecitase<sup>®</sup>, guinea pig pancreatic lipase-related protein 2 (known to be a PLA<sub>1</sub> enzyme), bee venom PLA<sub>2</sub> and porcine pancreatic PLA<sub>2</sub> were all used to validate the assay. The development of a sensitive enzymatic method, using coated substrates of PC analogues to natural lipids and based on the UV spectroscopic properties of  $\alpha$ -eleostearic acid, is a significant improvement compared to current assays used for measuring continuously PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> activities and/or their inhibitors.

**Keywords:** Phospholipase A<sub>1</sub>, Phospholipase A<sub>2</sub>, tung oil,  $\alpha$ -eleostearic acid,  $\beta$ -cyclodextrin, 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine, 1-octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine

## Abbreviations:

BHT, butylated hydroxytoluene;  $\beta$ -CD,  $\beta$ -cyclodextrin; DCC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; DMSO, dimethylsulfoxide; EEPC, 1,2- $\alpha$ -eleostearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; EOPC, 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine; GPC, *sn*-glycero-3-phosphocholine; GPL-RP<sub>2</sub>, guinea pig pancreatic lipase-related protein 2; hbPLA<sub>2</sub>, honey bee (*Apis mellifera*) venom PLA<sub>2</sub>; MI, methyl indoxam; OEPC, 1-octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine; PC, glycerophosphatidylcholine; ppPLA<sub>2</sub>, porcine pancreatic PLA<sub>2</sub>; Ppyr, 4-pyrrolidinopyridine.

## Introduction

Our knowledge of lipolytic enzymes has been substantially improved with the development of analytical technologies and the recognition of their various important functions in cells. Nevertheless, many mechanisms of lipolytic activity remain unclear and novel technologies are required for further investigations. Phospholipids are a major component in the lipid bilayer (50% of the cellular lipids is made up of glycerophosphatidylcholine (PC) (1)), together with plasmatic lipoprotein. Phospholipids can be hydrolyzed by phospholipases A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>, EC 3.1.1.32) or phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, EC 3.1.1.4) that catalyze hydrolysis of the ester bond of the acyl group attached to the *sn*-1 or the *sn*-2 position of phospholipid, respectively. At present the class of PLA<sub>1</sub> enzymes is not well understood and little structural information is available (2). Some reports have indicated that PLA<sub>1</sub>s could be considered as virulence factors (3) or as being responsible for the production of lysophospholipids that are implicated in many processes, such as angiogenesis or protein transport (4). The endothelial lipase known to be a PLA<sub>1</sub> is involved in cardiovascular diseases, promoting atherosclerosis, and consequently it is a major therapeutic target (5). Nevertheless, its mechanism has not been clearly elucidated. Pancreatic lipase-related protein 2, from guinea pig (GPL-RP<sub>2</sub>) and human (HPL-RP<sub>2</sub>), has been reported to have triglyceride lipase activity, PLA<sub>1</sub> and galactolipase activities (6-8). These enzymes are involved in lipid digestion and their inhibition could reduce obesity but the physiological involvement of their PLA<sub>1</sub> activity has not been established (7, 9). The PLA<sub>1</sub> activity currently reported (6-8) for pancreatic lipase-related protein 2 has usually been measured potentiometrically, and continuously, using egg PC as the substrate. However, this assay is not specific to the hydrolysis of the ester bond at the *sn*-1 position of the PC substrate and, consequently, it does not take into account a possible PLA<sub>2</sub> activity. In plants, PLA<sub>1</sub> catalyzes the initial step of jasmonic acid biosynthesis in wounding and in response to pathogen elicitors (10).

More is known about the PLA<sub>2</sub> family and it is composed of six different types of enzymes with numerous crystal structures (see reference (11) for review). The action of PLA<sub>2</sub> is implicated in signaling events, inflammation, host defense (12) and in various cancers (13). Extending our knowledge of PLA<sub>1</sub>s and PLA<sub>2</sub>s could lead to several applications in medicine and in biotechnology, as biosensors (14). Moreover, the design of a new generation of PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> inhibitors, such as synthesized phospholipid analogues or, more specifically, PLA<sub>2</sub> inhibitors containing dicarboxylic acids, sulfonamides and amide functions, is likewise promising in the field of medical care, with widespread applications (11). A combination of inhibitors, such as Orlistat and fenofibrate, has shown a positive effect in preventing cardiovascular disease (15). The number of potential inhibitors, and the number of PLA<sub>2</sub>s implicated, is rapidly expanding and this necessitates high throughput specific screening assays in order to discover new potential treatments.

PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> are water soluble lipolytic carboxylester hydrolases capable of releasing long-chain fatty acids from natural water-insoluble carboxylic esters, leading to an enzymatic reaction at the lipid-water interface (16). Consequently, these enzymes do not follow Michaelis-Menten kinetics in which both the enzyme and the substrate must be present in the same phase (16-18). Furthermore, the catalysis reaction strongly depends on the quality of the interface, such as an oil-in-water emulsion, liposomal dispersion or a monolayer (16, 17), and the use of lipidic substrates containing long-chain fatty acids must be taken into account when accurately assaying the lipolytic activity. All these parameters make it difficult to develop new reliable phospholipase assay systems. Nevertheless, numerous assays using chromogenic (19, 20), radiolabeled (21), or fluorogenic (22, 23) substrates, or indirect measurements (24), have been developed over the past decade. Some of them screen phospholipase activities with simple and easy to use molecules (25) and others use substances close to natural lipids (23, 26). However, these labeled substrates often present a sterically hindered fluorochrome group

(except with radiolabeled probes) and this may interfere with the lipolytic activity. Phospholipases are lipolytic carboxylester hydrolases capable of releasing long-chain fatty acids from natural water-insoluble carboxylic esters. The use of lipidic substrates containing these long-chain fatty acids must be taken into account when accurately assaying the lipolytic activity.

Crude tung oil (*Aleurites fordii* seed oil) contains up to 70%  $\alpha$ -eleostearic acid (9Z, 11E, 13E-octadecatrienoic acid), a naturally occurring 18-carbon fatty acid esterified mainly at the *sn*-1 and *sn*-3 positions of tung oil triglycerides (27). The conjugated triene present in  $\alpha$ -eleostearic acid constitutes an intrinsic chromophore, which confers strong ultraviolet (UV) absorption properties (27) on both the free fatty acid and the triglycerides. This makes a prime probe with no sterically hindered group. Various lipase assays have been developed based on these properties, using  $\alpha$ -eleostearic acid esterified into natural (28, 29) and synthetic triglycerides (30).

With the aim of developing a convenient, specific, sensitive and continuous UV spectrophotometric assay using a lipidic substrate for monitoring PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> activity, we have recently synthesized a specific PC: 1,2- $\alpha$ -eleostearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (EEPC), esterified at the *sn*-1 and *sn*-2 positions with  $\alpha$ -eleostearic acid (31). However, EEPC cannot be used to distinguish between PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activities due, on the one hand, to the presence of the same fatty acid at the *sn*-1 and *sn*-2 position and, on the other hand, to the migration of the fatty acyl chain yielding lysophosphatidylcholines (lyso-PCs) during lipolysis (32). In this study, we have synthesized, and then used, new PCs containing UV absorbing  $\alpha$ -eleostearic acid at the *sn*-1 or the *sn*-2 position and a non-absorbing and non-hydrolysable *O*-ether alkyl at the other *sn* position, able to monitor continuously the PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> activity, respectively. The design of these new PCs involves the presence of ether

bonds, non-hydrolysable by phospholipases and, therefore, preventing acyl chain migration during lipolysis which, in turn, presents a means of discriminating between PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activity.

## **Materials and Methods**

### *Synthesis of phosphatidylcholines containing $\alpha$ -eleostearic acid*

See Supporting Information.

### *Reagents and materials*

$\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD), butylated hydroxytoluene (BHT), DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide), 4-pyrrolidinopyridine (PPyr), Amberlyst 15 and crude tung oil were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chimie. Methyl Indoxam (MI) was kindly provided by Dr. D. Charmot, and tetrahydrolipstatin (THL), a known digestive lipase inhibitor, was obtained from Hoffmann-La-Roche Ltd. Microtiter plates (Costar<sup>®</sup> UV-Plate) were purchased from Corning Inc. Thin-layer chromatography (TLC) aluminum sheets, coated with 0.2 mm silica gel 60 F<sub>254</sub>, were purchased from Merck. All other chemicals and solvents of the highest quality were obtained from local suppliers.

### *Proteins*

Bovine serum albumin (BSA), porcine pancreatic PLA<sub>2</sub> (ppPLA<sub>2</sub>), honey bee (*Apis mellifera*) venom PLA<sub>2</sub> (hbPLA<sub>2</sub>) and Lecitase<sup>®</sup> were all purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chimie. Guinea pig pancreatic lipase-related protein 2 (GPL-RP<sub>2</sub>) was kindly provided by Dr F. Carrière. *Candida rugosa* lipase AY30 was obtained from Amano Pharmaceuticals Ltd. The protein concentrations were determined using Bradford's procedure (33), with Bio-Rad Dye Reagent and BSA as the standard.

### *Preparation of Purified $\alpha$ -Eleostearic Acid from Tung Oil*



A solution of 20 g of crude tung oil was hydrolyzed with 500 mg of *Candida rugosa* lipase in 14 mL of water and the reaction was stirred, for 3 h, at 40°C. Total lipids were extracted into a decantation vial with 100 mL of 3 M HCl and 100 mL of diethyl ether containing 0.01% BHT (w/v). The organic layer was recovered, dried by adding anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtrated, and concentrated under reduced pressure. The total lipid extract (5 g), containing mainly free fatty acids, was further purified by recrystallization in 5.5 mL of acetone, at 60°C for 20 min, and then cooled on ice. The heterogeneous mixture was filtrated and the crystalline solid obtained was treated with dry acetone. The crystals were then collected by filtration and dried *in vacuo* (2.2 g, 40% yield from the lipolysis extract). The specific UV spectrum obtained showed three majors peaks located at  $\lambda$  max (ethanol 95%) = 260, 270, and 280 nm.

#### *Thin-Layer Chromatography*

Glycerophospholipids were separated by performing analytical TLC on aluminum sheets coated with 0.2 mm silica gel 60. The sample migration was first performed with chloroform/methanol/water (65/35/5, v/v/v), containing 0.001% (w/v) BHT as an antioxidant, until the solvent front was halfway up the plate. The plate was dried and then placed in a second chamber containing hexane/diethyl ether/acetic acid (86/14/1, v/v/v), containing 0.001% (w/v) BHT, until the solvent front reached the top of the plate. The plate was dried again. The various lipids were revealed with UV light at 254 nm (to reveal  $\alpha$ -eleostearic-containing species) and by charring the plate after spraying it with 10% copper sulfate and 10% phosphoric acid in water (to reveal all the acyl species).

#### *Coating microtiter plates with synthetic phospholipids.*

Microtiter plates were coated with 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (EOPC) or 1-octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (OEPC), as described previously (29-31). The phospholipid solution (0.5 mg.mL<sup>-1</sup>) was

prepared in ethanol, containing 0.001% BHT as an antioxidant, and the wells of the UV-microtiter plate were filled with phospholipids (100  $\mu$ L/well). The microtiter plate was first partially dried under a fume hood and then left in a vacuum desiccator until the solvent had completely evaporated (around 30 min). After ethanol evaporation, the coated EOPC or OEPC plates were found to be stable in the dark for at least 1 week at 4°C.

#### *UV spectrophotometric PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> assays using coated synthetic phospholipids*

The PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activities were assayed spectrophotometrically by measuring the amount of  $\alpha$ -eleostearic acid continuously released from the phospholipid substrates. The enzyme activity measurement was performed using 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 3 g L<sup>-1</sup>  $\beta$ -CD, 150 mM NaCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM EDTA. The substrate was dissolved in ethanol to obtain the desired final concentration and the wells of a 96-well flat-bottomed microtiter plate were then coated with the lipids, as described above. The substrate-coated wells were subsequently washed with the assay buffer and left to equilibrate for 10 min at 37°C. The assays were run in a 200  $\mu$ L final volume at 37°C. The enzyme solutions (2-10  $\mu$ L) were injected into the microtiter plate wells and the absorbance, at 272 nm, was recorded continuously at regular 1 minute intervals against the buffer alone. A microtiter plate-scanning spectrophotometer (Tecan Infinite M200 Pro) was used. The plate was shaken for 5 seconds before each reading.

The specific activity of various enzymes used in this paper was calculated from the steady-state reaction rate, expressed as the change in absorbance per minute using an apparent molar extinction of 5320 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (see the Results and Discussion). The PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> specific activity was expressed as international units per mg of enzyme. One international unit corresponds to 1  $\mu$ mol of fatty acid released per minute under the assay conditions.

Alternatively, after various periods of time, the hydrolytic reaction was stopped by acidification, using 20  $\mu\text{L}$  of 0.1 M HCl, and the total aqueous phase (220  $\mu\text{L}$ ) was transferred to a glass vial. In order to maximize total lipid recovery, each well was washed twice with 100  $\mu\text{L}$  of ethanol and added to the aqueous phase. Lipids were then extracted with 1 mL of chloroform/methanol (2/1, v/v), shaken vigorously, and centrifuged for 1 min at 1000 x g. The lower organic phase was collected and transferred to a new glass tube and dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ .  $\text{MgSO}_4$  was removed by centrifugation for 1 min, at 1000 x g, and the clear lipid extract was transferred to a 2 mL vial. The remaining solvent was evaporated, under nitrogen flow to prevent oxidation, and the lipids were dissolved in 20  $\mu\text{L}$  of a mixture of chloroform / methanol (2/1, v/v) containing 0.001% BHT. A TLC analysis of the lipids was carried out using TLC pre-coated plates 60 F<sub>254</sub>, as described above.

#### *Microtiter plate assay to study PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> inhibition*

The enzyme-inhibitor incubation method (34) was used to test, in aqueous medium and in the absence of the substrate, whether any direct interactions could occur between the enzyme and the inhibitor. GPL-RP<sub>2</sub> (0.5  $\mu\text{g}$ , 69 nM) was incubated, at 25°C, with THL solution (4.8  $\mu\text{M}$  in dimethylsulfoxide (DMSO)) for 1h at an enzyme: inhibitor molar ratio of 1:70 (final DMSO concentration 2.5%). ppPLA<sub>2</sub> (0.5  $\mu\text{g}$ , 140 nM) was incubated, at 25°C, with MI solution (14  $\mu\text{M}$  in DMSO) for 1 h at an enzyme: inhibitor molar ratio of 1:100 (final DMSO concentration 2.5%). The residual enzyme activities were then measured using either EOPC or OEPC coated onto the surface of the microtiter plate wells.

## **Results and Discussion**

In our previous published work (31), we synthesized a specific PC (EEPC), esterified at both *sn*-1 and *sn*-2 positions with  $\alpha$ -eleostearic acid and coated onto microtiter plate wells to monitor continuously the PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> activities. However, the fact that the EEPC substrate

was esterified at both *sn*-positions of the PC with  $\alpha$ -eleostearic acid made it impossible to distinguish between the activities of these two enzymes. In the present work, two structural analogues of PC esterified with  $\alpha$ -eleostearic acid, either at the *sn*-1 (EOPC) or at the *sn*-2 (OEPC) position, and containing a non-UV absorbing and non-hydrolysable ether bond at the second position (Figure 1A), were synthesized and used as substrates to discriminate between PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activities. The ether bond was introduced to prevent intramolecular acyl group migration during lipolysis by PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub>.

#### *Synthesis of EOPC and OEPC, and their spectroscopic properties*

The  $\alpha$ -eleostearic acid was obtained from tung oil enzymatic hydrolysis, and it was recrystallized from the total lipid extract as reported previously (31). The synthesis of EOPC and OEPC (Figure S1) was achieved in eight steps from *rac*-glycidol, as summarized in Supporting Information. The usual coupling agent, DCC with PPyr (35) for the final acylation (Fig. S1, compounds 8 and 15), gave poor results. Another method was tested using oxalyl chloride (36) to generate the acyl chloride of  $\alpha$ -eleostearic acid before the final reaction, but without success. Finally, the best results were observed with DCC/ PPyr, as used by Borsotti *et al.* (37), promoting the acylation of lyso-PC (Fig. S1, compounds 7 and 14) with anhydride fatty acid derivatives, giving acceptable yields of 48% and 25% for EOPC and OEPC, respectively. The difference in the yields between the two substrates may be due to a steric hindrance at position *sn*-2. Moreover, the rather low yield obtained for this last step could be due to the specific treatments applied to eliminate any ionic species by exchange ionic chromatography (similar amphiphilic properties of PCs and Ppyr) during the purification process.

The final yields for the total synthesis of EOPC and OEPC were measured at 12% and 7%, respectively, over the 8 steps. As shown in Figure 1B, the UV absorption spectrum (230-300 nm) of an ethanolic solution of EOPC and OEPC displayed three major peaks located at 260,

270 and 280 nm. This profile spectrum is similar to that of pure  $\alpha$ -eleostearic acid (Figure 1B and (29)), pure tung oil triglycerides (28), synthetic triglycerides (30) and PC-containing  $\alpha$ -eleostearic acid (31). In aqueous buffer, a solvatochromic effect induced a 2 nm redshift of the UV absorption spectrum in which the major absorption peak was shifted from 270 nm to 272 nm, as described earlier (38).

#### *Principle of the PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> assay*

The principle of the assay using coated PCs has been described in our previous report (31) and is schematically shown in Figure 2. PCs were first dissolved in ethanol, containing BHT (0.001%, w/v), and injected into microtiter plate wells (Figure 2A). The UV absorption spectrum obtained was characteristic of pure  $\alpha$ -eleostearic acid, with three major peaks located at 262 nm, 272 nm and 282 nm, respectively. After ethanol evaporation under vacuum, the PCs remained as a thin film coating the wells. The assay buffer containing the non-tensioactive  $\beta$ -CD was then added and the thin PC films exhibited a UV spectrum with very low absorbance (Figure 2B) which cannot be desorbed by any interaction with the aqueous buffer. Following an enzyme injection, the released lipolysis products (free fatty acids and lyso-PCs) were solubilized into the aqueous buffer containing  $\beta$ -CD in order to solubilize the long-chain lipolysis products.  $\beta$ -CD (seven glucopyranoside units) was reported to form inclusion complexes with free fatty acids, as well as with monoglycerides (39) and lyso-PC (18, 40), at the air/water interface. The desorption rate of the water-insoluble reaction products ( $\alpha$ -eleostearic acid and non UV absorbing lyso-PC) probably involves the complexation of the single acyl chain into the  $\beta$ -CD hydrophobic cavity and the desorption, into the aqueous phase, of either soluble  $\alpha$ -eleostearic acid/ $\beta$ -CD or non UV absorbing lyso-PC/ $\beta$ -CD complexes. The solubilization of the long-chain lipolysis products prevents their accumulation at the interface which can lead to a modification of the “interfacial quality” of the lipid structures (17). Moreover, the UV absorbance of  $\alpha$ -eleostearic acid was considerably

enhanced due to its transition from the adsorbed state to the soluble state, and the lipolytic enzyme activity could be followed continuously by recording the variations of the UV absorption spectra with time (Figure 2 C). The optimal final concentration of  $\beta$ -CD in the reaction buffer has been previously shown to be 3 g.L<sup>-1</sup> (31).

#### *Enzyme Kinetic recordings using coated EOPC and OEPC as substrates*

To validate the assay method, hydrolysis of coated EOPC and OEPC was performed using GPL-RP<sub>2</sub>, Lecitase<sup>®</sup> ppPLA<sub>2</sub> and hbPLA<sub>2</sub>. GPL-RP<sub>2</sub> belongs to the pancreatic lipase gene family. In contrast to classical guinea pig pancreatic lipase, it has the ability to hydrolyze PC at the *sn*-1 position (9, 41). Lecitase<sup>®</sup> is a commercially available enzyme obtained from the fusion of the genes of *Thermomyces lanuginosus* lipase and *Fusarium oxysporum* phospholipase, known to hydrolyze specifically the *sn*-1 position of PC (42). As shown in Figure 3, a constant baseline was recorded prior to enzyme injection, indicating that the various PCs were not desorbed by any interaction with the buffer components. The same results were obtained when injecting heat-inactivated enzymes, indicating that PCs were also not desorbed by any interaction with proteins (data not shown).

Following an injection of GPL-RP<sub>2</sub> (Figure 3A) or Lecitase<sup>®</sup> (data not shown) onto coated EOPC, the absorbance at 272 nm increased rapidly, confirming the high PLA<sub>1</sub> activity of these lipases. However, no hydrolysis was observed when injecting either ppPLA<sub>2</sub> (Figure 3A) or hbPLA<sub>2</sub> (data not shown) onto coated EOPC due to the presence of a non-hydrolysable ether bond at the *sn*-2 position of the PC substrate.

Following the addition of ppPLA<sub>2</sub> (Figure 3B) or hbPLA<sub>2</sub> (data not shown) to coated OEPC, the reaction rate increased in a time-dependent manner, as reflected by the increase of absorbance measured at 272 nm. Interestingly, the addition of GPL-RP<sub>2</sub> (Figure 3B) and Lecitase<sup>®</sup> (data not shown) onto coated OEPC showed a weak, but significant, linear increase of absorbance at 272 nm. These findings indicate that GPL-RP<sub>2</sub> and Lecitase<sup>®</sup> are able to



release free  $\alpha$ -eleostearic acid from the *sn*-1 and the *sn*-2 positions of EOPC and OEPC, respectively. However, the PLA<sub>2</sub> activity measured for GPL-RP<sub>2</sub> and Lecitase<sup>®</sup>, using OEPC, was found to be around 10-fold and 28-fold lower, respectively, than their PLA<sub>1</sub> activity using EOPC (see Table 1).

The ability of pancreatic lipases-RP<sub>2</sub> to hydrolyze both the ester bonds at the *sn*-1 and *sn*-2 positions of PC has been previously reported (43) for HPL-RP<sub>2</sub>, using 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C] arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine as the substrate. HPL-RP<sub>2</sub> was found to hydrolyze both the ester bounds at the *sn*-1 and *sn*-2 positions of the PC substrate and the PLA<sub>1</sub> activity was estimated to be almost 2-times higher than the PLA<sub>2</sub> activity of HPL-RP<sub>2</sub>, as revealed by the intensity of the lipolysis product bands (43). The radiometric assay is, however, tedious and discontinuous. GPL-RP<sub>2</sub> and HPL-RP<sub>2</sub> belong to the pancreatic lipase gene family and, compared to classical lipases, they are reported to be more hydrophilic. Thus, GPL-RP<sub>2</sub> and HPL-RP<sub>2</sub> are able to accommodate phospholipids and galactolipids with large polar heads (7).

#### *TLC analysis of the lipolysis products*

To further validate the assay method, the lipolysis products were extracted from the wells of the microtiter plates and analyzed using TLC. The TLC analysis of the lipolysis products of GPLR-RP<sub>2</sub> on EOPC showed a decrease in EOPC content and the appearance of  $\alpha$ -eleostearic acid but not non-absorbing lyso-PC, as revealed with UV light (Figure 4A, UV 254 nm). When a TLC plate from the same experiment with EOPC was analyzed by charring, the appearance of lyso-PC, in addition to  $\alpha$ -eleostearic acid, was clearly observed (Figure 4A, charring). In contrast to GPL-RP<sub>2</sub>, and as expected, ppPLA<sub>2</sub> showed no hydrolysis products using EOPC as the substrate, as revealed with UV light and charring (Figure 4A).

The TLC analysis of the lipolysis products of a ppPLA<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis of OEPC showed clearly a qualitative decrease in the OEPC content and the appearance of UV

absorbing  $\alpha$ -eleostearic acid (Figure 4B, UV light) and non-absorbing lyso-PC (Figure 4B, charring). It is worth noting that the production of lyso-PC, due to the action of GPL-RP<sub>2</sub> on EOPC (Figure 4A, charring) or ppPLA<sub>2</sub> on OEPC (Figure 4B, charring), is only visible by lipid charring because of the absence of UV-absorbing groups ( $\alpha$ -eleostearic acid) in octadecyl-PC. The TLC analysis of the lipolysis products of a GPL-RP<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis of OEPC showed no significant decrease in the initial substrate content (Figure 4B). This result is in contrast with the observed PLA<sub>2</sub> activity of GPL-RP<sub>2</sub> using OEPC as the substrate, shown in Figure 3B. As indicated earlier, the PLA<sub>2</sub> activity of GPL-RP<sub>2</sub> on OEPC was seen to be almost 10-times lower than its activity on EOPC, under the same experimental conditions (see Table 1). Consequently, TLC is not sensitive enough to reveal the lipolysis products of a GPL-RP<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis of OEPC.

#### *Influence of the amount of enzyme on the steady-state reaction rates*

Using coated EOPC as the substrate, the steady-state reaction rate was found to be linear from 0.2 to 0.6  $\mu\text{g}/\text{well}$  for GPL-RP<sub>2</sub> (Figure 5A) and from 0 to 0.15  $\mu\text{g}/\text{well}$  for Lecitase<sup>®</sup> (Figure 5B). At a higher concentration of enzyme, any increase in the reaction rate was probably due to an excess of enzyme. It was established that as little as 1 ng of Lecitase<sup>®</sup> and 10 ng of GPL-RP<sub>2</sub> can be detected under standard conditions. These measurements correspond to 3 times the background observed with buffer alone. When using coated OEPC, the increase, with time, of the absorbance at 272 nm was recorded after injecting variable amounts of ppPLA<sub>2</sub> (Figure 5C) or hbPLA<sub>2</sub> (Figure 5D). In both cases, the steady-state reaction rate was found to be linear with time and proportional to the range of 0 to 0.8  $\mu\text{g}$  of enzyme per well. The detection limit, under standard conditions, was as low as 5 ng of ppPLA<sub>2</sub> and hbPLA<sub>2</sub>. A similar sensitivity of the assay towards these enzymes has been previously observed using coated EEPC as the substrate (31). This assay shows a 100-1000 times higher sensitivity of enzyme detection than the pH-stat method (1  $\mu\text{g}$ ) which is routinely used to measure PLA<sub>2</sub>

activity with PC (44). Moreover, the small amount of PLA<sub>2</sub> (5 ng) detected in our assay system was shown to be in the same range as that reported for PLA<sub>2</sub> from *Naja naja* (45) (1 ng) and for calcium-dependent secretory PLA<sub>2</sub>-IIA (46) (0.4 ng), using synthetic fluorescent substrates. Nevertheless, this method is still less sensitive than the radiometric or gold standard mass spectrometry end point methods (47, 48).

#### *Estimation of the specific activity*

The apparent molar extinction coefficient ( $\epsilon_{\text{app}}$ ) of  $\alpha$ -eleostearic acid has been previously determined by recording the absorbance, at 272 nm, of coated EEPC and various amounts of  $\alpha$ -eleostearic acid per well and it was found to be  $5320 \pm 160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (31). Under these conditions, the increase, with time, of the absorbance at 272 nm ( $A_{272 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$ ) was converted into  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of enzyme.

Using coated EOPC as the substrate, the specific activity of Lecitase<sup>®</sup> and GPL-RP<sub>2</sub> was calculated to be 2.2 and 0.3  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectively (Table 1). As expected for EOPC with an ether bond at the *sn*-2 position, no detectable activity was found for ppPLA<sub>2</sub> (Figure 3A and Table 1) or hbPLA<sub>2</sub> (Table 1). For the sake of comparison, the specific activity of pure GPL-RP<sub>2</sub> on egg yolk PC, using the pH-technique, was shown to be 45  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (49). It is important to note that the stirring and emulsification conditions differ considerably depending on whether a microplate or a mechanically stirred pH-stat vessel is used. Using coated OEPC as the substrate, the specific activities of ppPLA<sub>2</sub> and hbPLA<sub>2</sub> were found to be 0.25 and 0.78  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectively (Table 1). Under the same experimental conditions, the specific activity of Lecitase<sup>®</sup> and GPL-RP<sub>2</sub> was calculated to be 0.08 and 0.03  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectively (Table 1). The activity of Lecitase<sup>®</sup> and GPL-RP<sub>2</sub> on EOPC was found to be approximately 28 times and 10 times higher than on OEPC, respectively (Table 1).

Access to the active site of classical pancreatic lipase is controlled by a surface loop, the lid, which normally only undergoes conformational changes following the addition of lipids or amphiphiles. A deletion within the lid domain was, however, observed in GPL-RP<sub>2</sub>, which is able to accommodate more hydrophilic substrates, such as phospholipids and galactolipids with large polar head groups (50), than classical pancreatic lipase. The addition of the classical pancreatic lipase lid to GPL-RP<sub>2</sub> has been shown to decrease, but not abolish, the phospholipase activity suggesting that the lid contributes to substrate specificity (51). Moreover, GPL-RP<sub>2</sub> was shown to be produced at a high level in guinea pig lacking pancreatic PLA<sub>2</sub>, suggesting a significant role of this enzyme in phospholipid digestion (52). Our study demonstrates for the first time, to the best of our knowledge, a PLA<sub>2</sub> activity of GPL-RP<sub>2</sub> and Lecitase<sup>®</sup> in addition to their triglyceride lipase and PLA<sub>1</sub> activities.

#### *Application of the microplate assay for screening potential PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> inhibitors*

An important feature of this work is the ability to screen new potential PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> inhibitors. THL and MI are known to inhibit lipolytic carboxylester hydrolases (53) and PLA<sub>2</sub> (54), respectively. Using coated OEPC as the substrate, an injection of ppPLA<sub>2</sub>, pre-incubated (for 1 h) with a 100 molar excess of MI, leads to approximately 50% inactivation of the enzyme (Figure 6). In our previous report (31), we have shown that the pre-incubation of ppPLA<sub>2</sub> (1h) with a 50 or 100 molar excess of MI reduced the enzyme activity by 69% or 79%, respectively.

Using coated EOPC as the substrate, GPL-RP<sub>2</sub> was inhibited by about 50% when pre-incubated for 1h at an enzyme:THL molar ratio of 1:70 (Figure 6). THL is known to be a digestive lipase catalytic inhibitor and it has been shown to inhibit the triglyceride lipase activity of GPL-RP<sub>2</sub>, even in the absence of an interface (7). The fact that both the lipase and phospholipase activities of GPL-RP<sub>2</sub> are inhibited by THL is an indication that the same catalytic environment is involved for both activities. The same results were obtained with

Lecitase<sup>®</sup>. This enzyme activity was inhibited by about 40% when pre-incubated, for 1 h, at an enzyme:THL molar ratio of 1:100 (data not shown).

## Conclusions

In the method described in this paper, new synthetic PC derivatives with close structural analogy to natural substrates were designed, esterified with a naturally occurring conjugated polyene fatty acid with specific optical properties, and substituted with one non UV-absorbing ether-bonded chain. Since these ether bonds are non-hydrolysable by phospholipases, no acyl chain migration could occur during lipolysis, thus providing the possibility of discriminating accurately between PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activities. In addition, the lipidic character of these PC analogues presents a significant qualitative advantage over other methods. Furthermore, this assay is specific, continuous and sensitive, and it allows screening of new PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub> activities and/or their inhibitors present in various biological samples. Using this technique, we have demonstrated, for the first time, the existence of the PLA<sub>2</sub> activity of GPL-RP<sub>2</sub>, in addition to its PLA<sub>1</sub> activity.

## **Acknowledgments**

We gratefully acknowledge support from the “Région Rhône-Alpes” Programme CIBLE-2012-1201080801. Meddy El Alaoui was supported by a Ph.D grant from the “Région Rhône-Alpes” (€32,116/year). English revision by Valerie James is also acknowledged.



## References

1. van Meer G. 2005. Cellular lipidomics. *EMBO J.* 24:3159-3165.
2. Murayama K., K. Kano, Y. Matsumoto, D. Sugimori. 2013. Crystal structure of phospholipase A1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297. *J Struct Biol.* 182:192-196.
3. Shimuta K., M. Ohnishi, S. Iyoda, N. Gotoh, N. Koizumi, H. Watanabe. 2009. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. *BMC Microbiol.* 9:261.
4. Hla T., M. J. Lee, N. Ancellin, J. H. Paik, M. J. Kluk. 2001. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science.* 294:1875-1878.
5. Yasuda T., T. Ishida, D. J. Rader. 2010. Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J.* 74:2263-2270.
6. Amara S., V. Delorme, M. Record, F. Carriere. 2012. Inhibition of phospholipase A1, lipase and galactolipase activities of pancreatic lipase-related protein 2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP). *Biochim Biophys Acta.* 1821:1379-1385.
7. Eydoux C., J. De Caro, F. Ferrato, P. Boullanger, D. Lafont, R. Laugier, et al. 2007. Further biochemical characterization of human pancreatic lipase-related protein 2 expressed in yeast cells. *J Lipid Res.* 48:1539-1549.
8. Xiao X., L. E. Ross, W. A. Sevilla, Y. Wang, M. E. Lowe. 2013. Porcine pancreatic lipase related protein 2 has high triglyceride lipase activity in the absence of colipase. *Biochim Biophys Acta.* 1831:1435-1441.
9. Withers-Martinez C., F. Carriere, R. Verger, D. Bourgeois, C. Cambillau. 1996. A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity: crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig. *Structure.* 4:1363-1374.

10. Noiriél A., P. Benveniste, A. Banas, S. Stymne, P. Bouvier-Nave. 2004. Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem.* 271:3752-3764.
11. Dennis E. A., J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magrioti, G. Kokotos. 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev.* 111:6130-6185.
12. Murakami M., Y. Taketomi, Y. Miki, H. Sato, K. Yamamoto, G. Lambeau. 2014. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: the 3rd edition. *Biochimie.* 107 Pt A:105-113.
13. Brglez V., G. Lambeau, T. Petan. 2014. Secreted phospholipases A2 in cancer: diverse mechanisms of action. *Biochimie.* 107 Pt A:114-123.
14. Herrera-Lopez E. J. 2012. Lipase and phospholipase biosensors: a review. *Methods Mol Biol.* 861:525-543.
15. Filippatos T. D., I. F. Gazi, E. N. Liberopoulos, V. G. Athyros, M. S. Elisaf, A. D. Tselepis, et al. 2007. The effect of orlistat and fenofibrate, alone or in combination, on small dense LDL and lipoprotein-associated phospholipase A2 in obese patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 193:428-437.
16. Schmid R. D., R. Verger. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed.* 37:1608-1633.
17. Panaitov I., R. Verger. 2000. Enzymatic reactions at interfaces: Interfacial and temporal organization of enzymatic lipolysis. In: Baszkin A, Norde W, editors. *Physical Chemistry of Biological Interfaces*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc; p. 359-400.
18. Ransac S., M. Ivanova, R. Verger, I. Panaitov. 1997. Monolayer techniques for studying lipase kinetics. *Methods Enzymol.* 286:263-292.

19. Wang D., J. Wang, B. Wang, H. Yu. 2012. A new and efficient colorimetric high-throughput screening method for triacylglycerol lipase directed evolution. *J Mol Catal B Enzym.* 82:18-23.
20. Zhang W., Y. Tang, J. Liu, L. Jiang, W. Huang, F. W. Huo, et al. 2015. Colorimetric assay for heterogeneous-catalyzed lipase activity: enzyme-regulated gold nanoparticle aggregation. *J Agric Food Chem.* 63:39-42.
21. van den Bosch H., J. G. de Jong, A. J. Aarsman. 1991. Phospholipase A2 from rat liver mitochondria. *Methods Enzymol.* 197:365-373.
22. Darrow A. L., M. W. Olson, H. Xin, S. L. Burke, C. Smith, C. Schalk-Hihi, et al. 2011. A novel fluorogenic substrate for the measurement of endothelial lipase activity. *J Lipid Res.* 52:374-382.
23. Mitnaul L. J., J. Tian, C. Burton, M. H. Lam, Y. Zhu, S. H. Olson, et al. 2007. Fluorogenic substrates for high-throughput measurements of endothelial lipase activity. *J Lipid Res.* 48:472-482.
24. Huang C., L. Zhou, Y. Liu, L. Lai. 2006. A continuous fluorescence assay for phospholipase A2 with nontagged lipid. *Anal Biochem.* 351:11-17.
25. Petrovic N., C. Grove, P. E. Langton, N. L. Misso, P. J. Thompson. 2001. A simple assay for a human serum phospholipase A2 that is associated with high-density lipoproteins. *J Lipid Res.* 42:1706-1713.
26. Basu D., X. Lei, J. Josekutty, M. M. Hussain, W. Jin. 2013. Measurement of the phospholipase activity of endothelial lipase in mouse plasma. *J Lipid Res.* 54:282-289.
27. Radunz A., P. He, G. H. Schmid. 1998. Analysis of the seed lipids of *Aleurites montana*. *Z Naturforsch.* 53:305–310.

28. Pencreac'h G., J. Graille, M. Pina, R. Verger. 2002. An ultraviolet spectrophotometric assay for measuring lipase activity using long-chain triacylglycerols from *Aleurites fordii* seeds. *Anal Biochem.* 303:17-24.
29. Serveau-Avesque C., R. Verger, J. A. Rodriguez, A. Abousalham. 2013. Development of a high-throughput assay for measuring lipase activity using natural triacylglycerols coated on microtiter plates. *Analyst.* 138:5230-5238.
30. Mendoza L. D., J. A. Rodriguez, J. Leclaire, G. Buono, F. Fotiadu, F. Carriere, et al. 2012. An ultraviolet spectrophotometric assay for the screening of sn-2-specific lipases using 1,3-O-dioleoyl-2-O- $\alpha$ -eleostearoyl-sn-glycerol as substrate. *J Lipid Res.* 53:185-194.
31. El Alaoui M., A. Noiriél, L. Souleré, L. Grand, Y. Queneau, A. Abousalham. 2014. Development of a high-throughput assay for measuring phospholipase A activity using synthetic 1,2- $\alpha$ -eleostearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine coated on microtiter plates. *Anal Chem.* 86:10576-10583.
32. Mu H. L., J. P. Kurvinen, H. Kallio, X. B. Xu, C. E. Hoy. 2001. Quantitation of acyl migration during lipase-catalyzed acidolysis, and of the regioisomers of structured triacylglycerols formed. *J Am Oil Chem Soc.* 78:959-964.
33. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
34. Ransac S., Y. Gargouri, F. Marguet, G. Buono, C. Beglinger, P. Hildebrand, et al. 1997. Covalent inactivation of lipases. *Methods Enzymol.* 286:190-231.
35. Rosseto R., C. M. Tcacenco, R. Ranganathan, J. Hajdu. 2008. Synthesis of Phosphatidylcholine Analogues Derived from Glyceric Acid: a New Class of Biologically Active Phospholipid Compounds. *Tetrahedron Lett.* 49:3500-3503.

36. Tully S. E., B. F. Cravatt. 2010. Activity-based probes that target functional subclasses of phospholipases in proteomes. *J Am Chem Soc.* 132:3264-3265.
37. Borsotti G., G. Guglielmetti, S. Spera, E. Battistel. 2001. Synthesis of phosphatidylcholines containing ricinoleic acid. *Tetrahedron Lett.* 57:10219-10227.
38. Reichardt C. 1994. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem Rev.* 94:2319–2358.
39. Laurent S., M. G. Ivanova, D. Pioch, J. Graille, R. Verger. 1994. Interactions between  $\beta$ -Cyclodextrin and insoluble glyceride monomolecular films at the argon/water interface: application to lipase kinetics. *Chem Phys Lipids.* 70:35-42.
40. Ivanova M., R. Verger, I. Panaiotov. 1997. Mechanisms underlying the desorption of long-chain lipolytic products by cyclodextrins: application to lipase kinetics in monolayer. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 10:1-12.
41. Aloulou A., Y. B. Ali, S. Bezzine, Y. Gargouri, M. H. Gelb. 2012. Phospholipases: an overview. *Methods Mol Biol.* 861:63-85.
42. Bojsen K., K. Borch, G. Budolfson, K. C. Fuglsang, S. S. Glad, A. Petri, et al., inventors; Lipolytic enzyme variants 2000.
43. Aloulou A., F. Frikha, A. Noiriél, M. Bou Ali, A. Abousalham. 2014. Kinetic and structural characterization of triacylglycerol lipases possessing phospholipase A1 activity. *Biochim Biophys Acta.* 1841:581-587.
44. Abousalham A., R. Verger. 2000. Egg yolk lipoproteins as substrates for lipases. *Biochim Biophys Acta.* 1485:56-62.
45. Kinkaid A. R., D. C. Wilton. 1993. A continuous fluorescence displacement assay for phospholipase A2 using albumin and medium chain phospholipid substrates. *Anal Biochem.* 212:65-70.

46. Tsao F. H., D. Shanmuganayagam, D. K. Zachman, M. Khosravi, J. D. Folts, K. C. Meyer. 2007. A continuous fluorescence assay for the determination of calcium-dependent secretory phospholipase A2 activity in serum. *Clin Chim Acta*. 379:119-126.
47. Hsu Y. H., D. S. Dumlao, J. Cao, E. A. Dennis. 2013. Assessing phospholipase A2 activity toward cardiolipin by mass spectrometry. *PLoS One*. 8:e59267.
48. Marshall J., E. Krump, T. Lindsay, G. Downey, D. A. Ford, P. Zhu, et al. 2000. Involvement of cytosolic phospholipase A2 and secretory phospholipase A2 in arachidonic acid release from human neutrophils. *J Immunol*. 164:2084-2091.
49. Carriere F., K. Thirstrup, S. Hjorth, F. Ferrato, P. F. Nielsen, C. Withers-Martinez, et al. 1997. Pancreatic lipase structure-function relationships by domain exchange. *Biochemistry*. 36:239-248.
50. Carrière F., C. Withers-Martinez, H. van Tilbeurgh, A. Roussel, C. Cambillau, R. Verger. 1998. Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1376:417-432.
51. Yang Y., M. E. Lowe. 2000. The open lid mediates pancreatic lipase function. *J Lipid Res*. 41:48-57.
52. Fauvel J., M. J. Bonnefis, L. Sarda, H. Chap, J. P. Thouvenot, L. Douste-Blazy. 1981. Purification of two lipases with high phospholipase A<sub>1</sub> activity from guinea-pig pancreas. *Biochim Biophys Acta*. 663:446-456.
53. Ben Ali Y., H. Chahinian, S. Petry, G. Muller, F. Carriere, R. Verger, et al. 2004. Might the kinetic behavior of hormone-sensitive lipase reflect the absence of the lid domain? *Biochemistry*. 43:9298-9306.
54. Hui D. Y., M. J. Cope, E. D. Labonte, H. T. Chang, J. Shao, E. Goka, et al. 2009. The phospholipase A(2) inhibitor methyl indoxam suppresses diet-induced obesity and glucose intolerance in mice. *Br J Pharmacol*. 157:1263-1269.



## Figure legends

**Figure 1:** Chemical structure and UV absorption spectra of EOPC and OEPC. A) Chemical structure of EOPC and OEPC. B) UV absorption spectra of  $\alpha$ -eleostearic acid ( $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), EOPC ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and OEPC ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dissolved in ethanol containing BHT 0.001%.

**Figure 2:** Principle of the coated PC assay. (A) A microtiter plate well containing EOPC or OEPC, dissolved in ethanol, and a UV absorption spectrum of purified PCs in ethanol exhibited three major peaks located at 260, 270, and 280 nm. (B) After solvent evaporation, the assay buffer containing  $\beta$ -CD ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ , final concentration) was added and the coated PCs exhibited a UV spectrum with low absorbance. C) Kinetic UV absorption spectra following coated EOPC or OEPC lipolysis by injecting PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub>, respectively. The UV spectra, corresponding to the ppPLA<sub>2</sub> lipolysis products, were determined every 3 min, for 30 min, in the 250–300 nm range.

**Figure 3:** Time course of the enzymatic hydrolysis of OEPC or EOPC coated on microtiter plate wells. Kinetic recordings of coated EOPC (A) and OEPC (B) enzymatic lipolysis by GPL-RP<sub>2</sub> or ppPLA<sub>2</sub>, respectively. After PC coating, variations, with time, of the absorbance at 272 nm were recorded for 10 min, for stabilization, and then for 50 min after GPL-RP<sub>2</sub> or ppPLA<sub>2</sub> injection ( $0.5 \mu\text{g}$  per well). The kinetic recordings shown here are typical of those obtained in three independent experiments.

**Figure 4:** Analysis by TLC of coated EOPC (A) and OEPC (B) hydrolysis revealed with UV light at 254 nm (left panels) and with 10% copper sulfate and 10% phosphoric acid in water, followed by charring at 150°C for 15 min (right-hand panels). The standards (std) used ( $10 \mu\text{g}$  of each compound) were  $\alpha$ -eleostearic acid, EOPC and OEPC. Coated PCs were hydrolyzed by GPL-RP<sub>2</sub> or ppPLA<sub>2</sub> ( $0.5 \mu\text{g/well}$ ). The chromatographic solvent system was

chloroform/methanol/water (65/35/4, v/v/v) and hexane/diethylether/acetic acid (84/16/1, v/v/v) containing 0.001% (w/v) BHT.

**Figure 5:** Effects of the amount of enzyme on the steady state reaction rate. Effects of varying amounts of enzyme on the steady state reaction rate using coated EOPC (panels A and B) or coated OEPC (panels C and D). Variable amounts of GPL-RP<sub>2</sub>, Lecitase<sup>®</sup>, ppPLA<sub>2</sub> or hbPLA<sub>2</sub> were injected into the microplate well, containing the coated PC, in 200  $\mu$ L of standard buffer. The increase in the absorbance at 272 nm was recorded for 20-40 min after the enzyme injection, and the initial velocity ( $\Delta m A_{272nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ) was used for reaction rate determination. Results are given as means  $\pm$  SD for three independent experiments.

**Figure 6:** Validation of the assay to study PLA<sub>1</sub> or PLA<sub>2</sub> inhibition. Either GPL-RP<sub>2</sub> or ppPLA<sub>2</sub> was incubated with THL (enzyme:inhibitor, molar ratio of 1:70) or with MI (enzyme:inhibitor, molar ratio of 1:100), respectively, in the absence of the substrate. The residual activities of GPL-RP<sub>2</sub> or ppPLA<sub>2</sub> were then measured, using coated EOPC or OEPC, respectively, as described in the Methods section, and expressed as a percentage relative to the activity measured in the absence of inhibitor. Results are given as means  $\pm$ SD for three independent experiments.

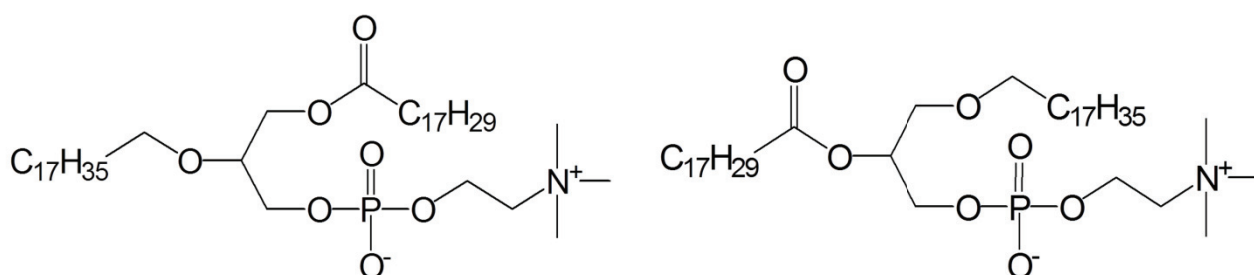
**Table 1:** Estimation of enzyme specific activities using OEPC or EOPC coated on microtiter plate wells. Comparison of specific activities of Lecitase<sup>®</sup>, GPL-RP<sub>2</sub>, hbPLA<sub>2</sub> and ppPLA<sub>2</sub> using EOPC or OEPC coated on microtiter plate wells. Results are given as means  $\pm$  SD for three independent experiments. \* : below the detection limit, estimated as 3 times the background obtained with buffer alone.

Enzyme/Substrate	Specific activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )			
	Lecitase	GPL-RP <sub>2</sub>	ppPLA <sub>2</sub>	hbPLA <sub>2</sub>
EOPC	$2.20 \pm 0.30$	$0.300 \pm 0.019$	0*	0*
OEPC	$0.08 \pm 0.01$	$0.030 \pm 0.003$	$0.250 \pm 0.002$	$0.780 \pm 0.039$
EOPC/OEPC ratio	27.5	10	0	0

# FIGURES:

Figure 1

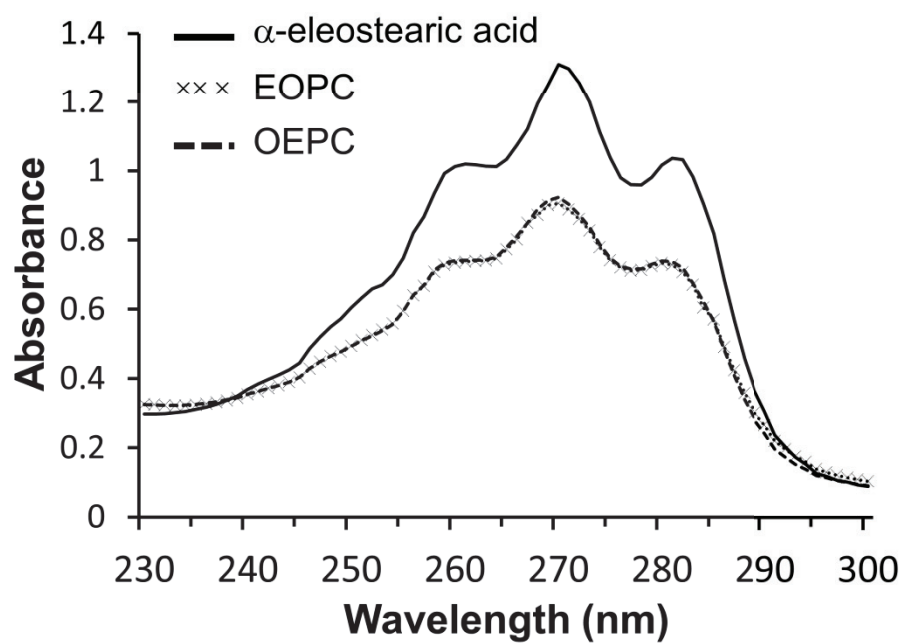
A



**1-α-eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (EOPC)**

**1-octadecyl-2-α-eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (OEPC)**

B



Figure

2

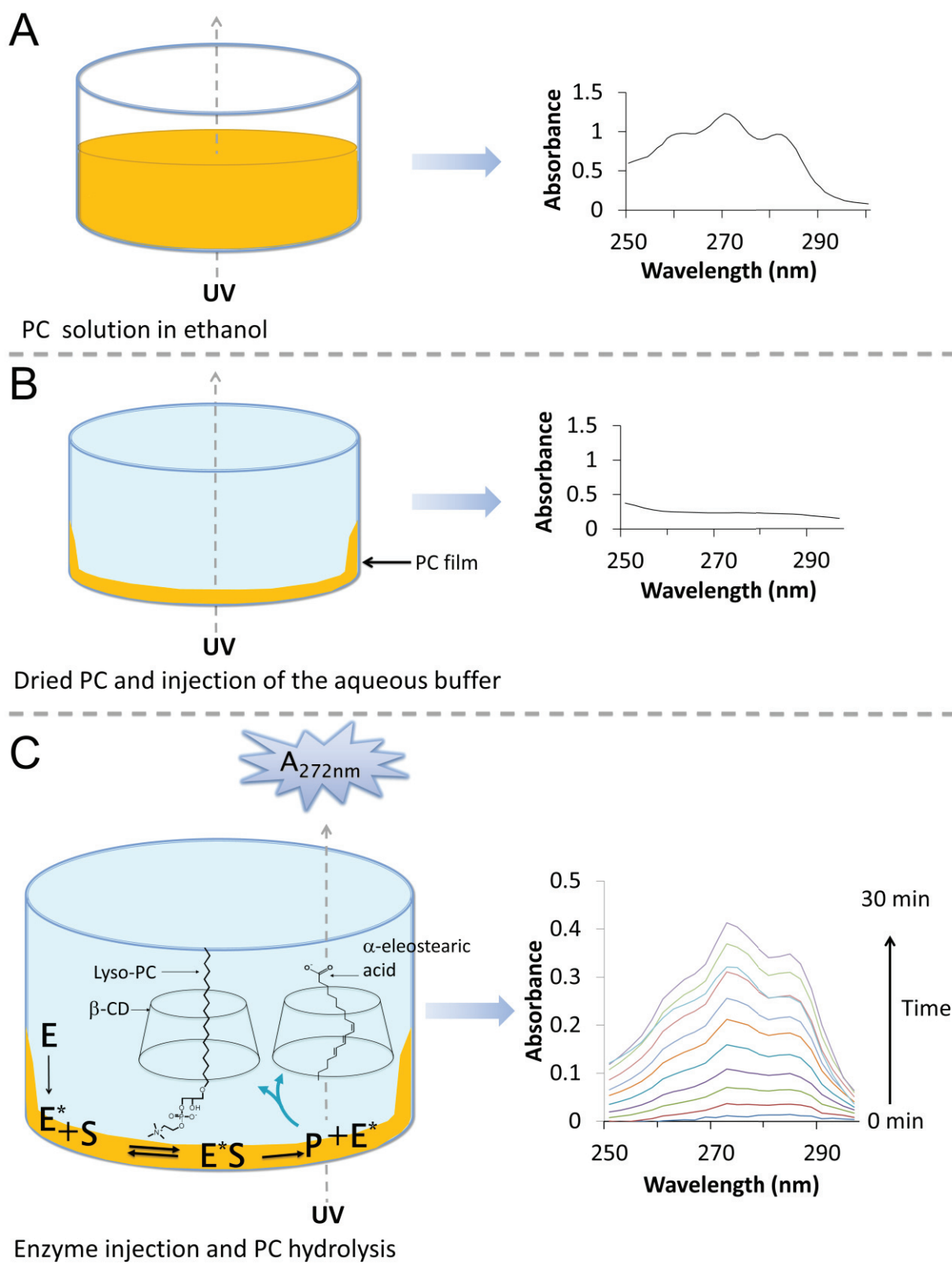


Figure 3

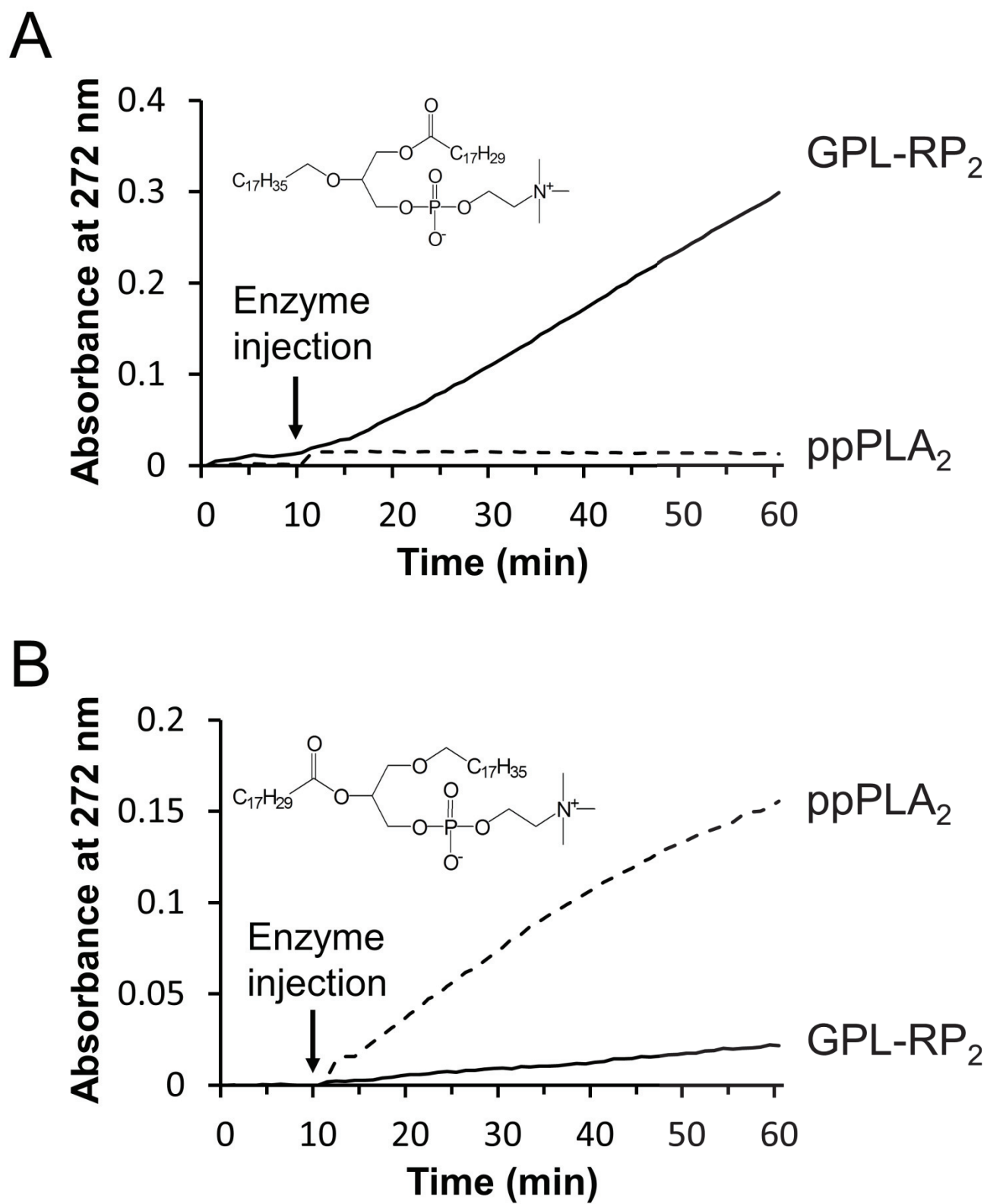




Figure 4

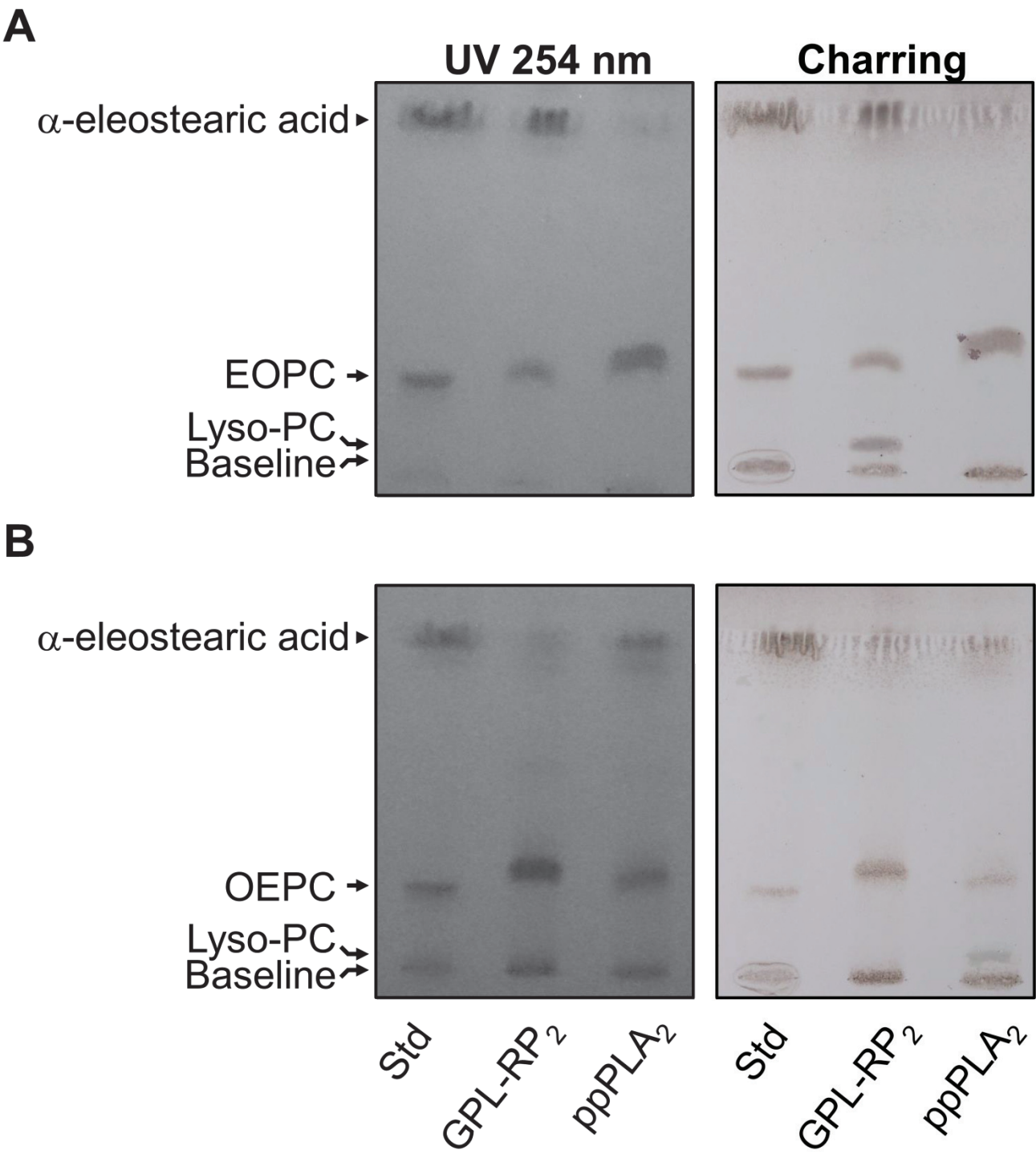


Figure 5

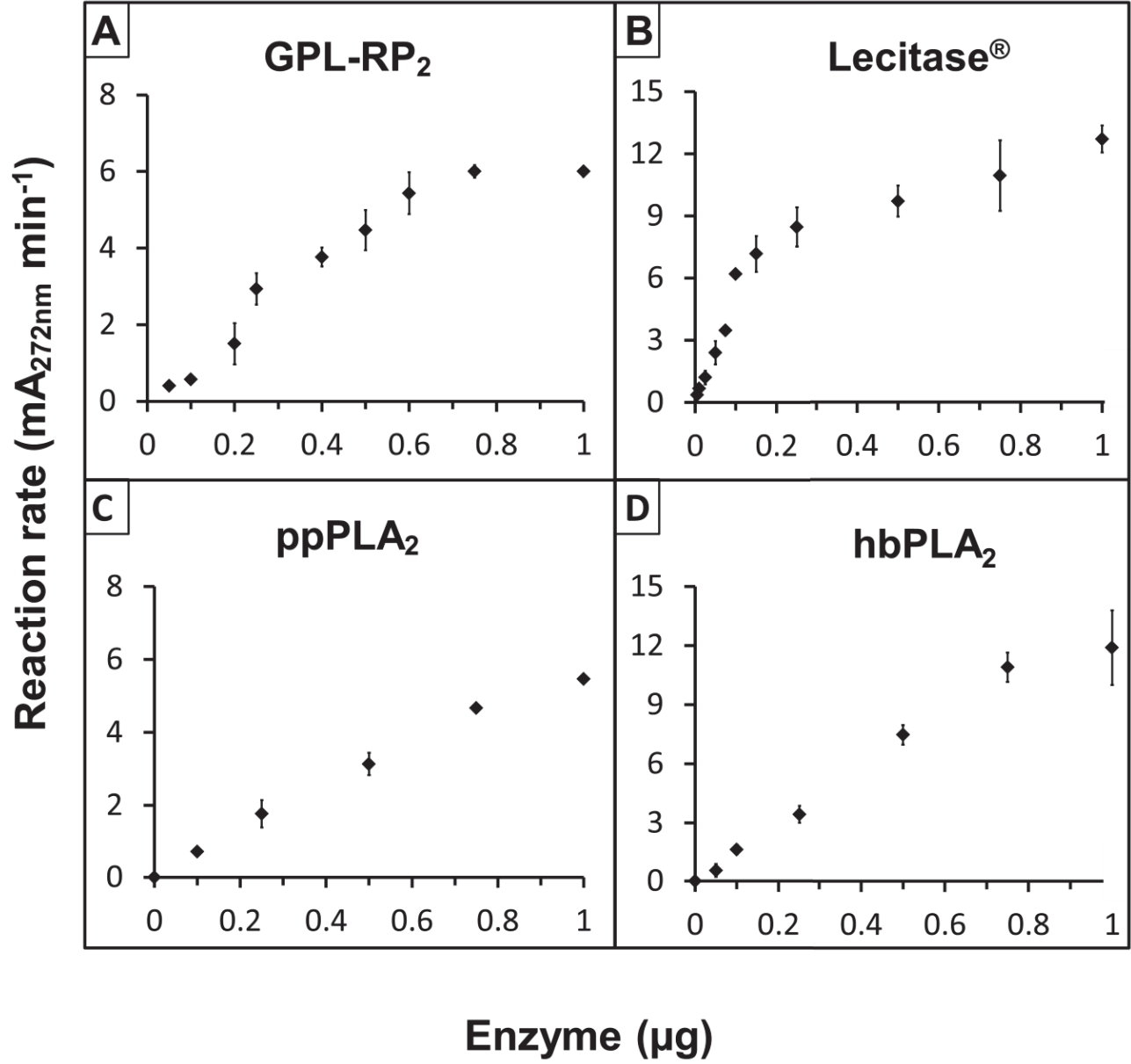
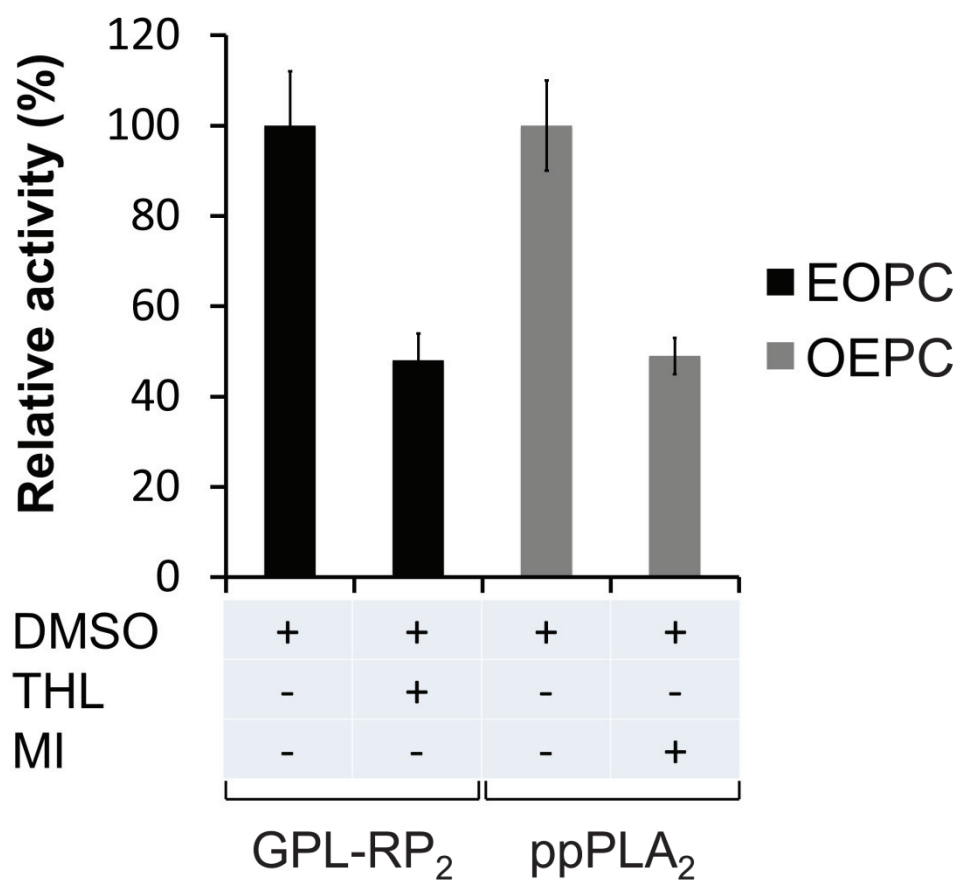


Figure 6



# A continuous spectrophotometric assay that distinguishes between phospholipase A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> activities

Meddy El Alaoui<sup>†,‡</sup>, Laurent Soulère<sup>‡</sup>, Alexandre Noiriel<sup>†</sup>, Florence Popowycz<sup>‡</sup>, Abdallah Khatib<sup>†</sup>, Yves Queneau<sup>‡</sup> and Abdelkarim Abousalham<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup> Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques, Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR 5246 CNRS, Université Lyon 1, Bât Raulin, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>‡</sup> Université de Lyon, INSA Lyon, ICBMS, Chimie Organique et Bioorganique, UMR 5246 CNRS, Université Lyon 1, INSA Lyon, CPE Lyon, Bâtiment Jules Verne, 20 Avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France.

## SUPPORTING INFORMATION

Synthesis of phosphatidylcholines containing  $\alpha$ -eleostearic acid: 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine and 1-octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine

## Synthesis of 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (EOPC)

### 1-Benzyl-3-trityl-*rac*-glycidol (**2**)

According to literature<sup>1</sup>, to a stirred solution of NaH (60% dispersion in oil, 1.27 g, 34 mmol) in DMF (12 mL), a solution of benzyl alcohol (3.2 mL, 34 mmol) in DMF (6 mL) was stirred at room temperature for 15 min. Then a solution of trityl glycidol **1** (2 g, 6.3 mmol) in DMF (5 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at 100°C for 2.5 h. After cooling, the mixture was diluted in H<sub>2</sub>O (20 mL) and extracted with ether (3x 30 mL). The combined organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and evaporated. Excess of benzyl alcohol was distilled at (bath temperature 100°C, 130 Pa) and the residue was purified by column chromatography on silica gel (120 g, Ethyl acetate/petroleum ether 25:75 v/v) to afford 1-benzyl-3-trityl-*rac*-glycidol **2** (2.13 g, 80%) as a yellow oil.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.20-3.28 (m, 2H, *sn*-1 CH<sub>2</sub>), 3.5-3.61 (m, 2H, *sn*-3 CH<sub>2</sub>), 3.99-4.02 (m, 1H, *sn*-2 CH<sub>2</sub>), 4.54 (s, 2H), 7.23-7.45 (m, 20H, Ar); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  64.7 (C *sn*-1), 70.1 (C *sn*-2), 71.7 (C *sn*-3), 73.5 (CH<sub>2</sub> Ar), 86.8 (C-Ar<sub>3</sub>), 127.1, 127.2, 127.78, 127.81, 127.83, 127.93, 128.53, 128.69, 128.80 and 144.0 (Ar); MS calculated for C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>NaO<sub>3</sub><sup>+</sup>: 447.2. Found [M+Na]<sup>+</sup>: 447.2

### 1-Benzyl-2-octadecyl-3-trityl-*rac*-glycerol (**3**)

To a solution of 1-benzyl-3-trityl-*rac*-glycidol **2** (1.15 g, 2.72 mmol), 1-bromooctadecane (2.26 g, 6.79 mmol) and (*n*-Bu)<sub>4</sub>NBr (0.087 g, 0.269 mmol) in anhydrous toluene (10 mL) was added <sup>tert</sup>-BuOK (0.458 g, 4.08 mmol). The heterogeneous reaction mixture was refluxed at 100°C for 2 h, then cooled and concentrated. The residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL), washed with H<sub>2</sub>O (20 mL), dried with MgSO<sub>4</sub> and then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/petroleum ether 33:66 v/v) providing 1-benzyl-2-octadecyl-3-trityl-*rac*-glycerol **3** (1.3 g, 68%)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.86 (t, 3H, *J*=6.7 Hz, C18-CH<sub>3</sub>), 1.23 (br s, 30H, C(3-17)-CH<sub>2</sub>), 1.53-1.60 (m, 2H, C2-CH<sub>2</sub>), 3.20 (s, 2H, *sn*-3 CH<sub>2</sub>), 3.58-3.70 (m, 5H, *sn*-1 CH<sub>2</sub>, *sn*-2 CH, C1-CH<sub>2</sub>), 4.50 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 7.26-7.53 (m, 20H, Ar); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.3 (C18), 22.8 (C17), 26.3 (C3), 29.5 (C15), 29.7 (C4), 29.8-29.9 (C5-C14), 30.3 (C16), 32.1 (C2), 63.6 (C1), 70.6 and 70.9 (C *sn*-1 and *sn*-3), 73.4 (CH<sub>2</sub> Ar), 78.5 (C *sn*-2), 86.7 (C-Ar<sub>3</sub>), 122.0, 127.6, 127.6, 127.9, 128.4, 128.9, 138.6 and 144.3 (Ar); MS calculated for C<sub>47</sub>H<sub>64</sub>NaO<sub>3</sub><sup>+</sup>: 699.5. Found [M+Na]<sup>+</sup>: 699.4

### 1-Benzyl-2-octadecyl-*rac*-glycerol (**4**)

To a solution of 1-benzyl-2-octadecyl-3-trityl-*rac*-glycerol **3** (0.8 g, 1.2 mmol), in MeOH (40 mL), camphorsulfonic acid (55 mg, 0.24 mmol) was added. The heterogeneous reaction mixture was stirred for 18 hours at room temperature and poured into a mixture of sat. aq NH<sub>4</sub>Cl (50 mL) and water (20 mL). The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 30 mL). The combined organic solution was dried with MgSO<sub>4</sub> and then concentrated. The residue was purified by column chromatography (Pentane/Ethyl Acetate 85:15 v/v) giving 1-benzyl-2-octadecyl-*rac*-glycerol **4** (0.44 g, 85%).

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz, C18- $\text{CH}_3$ ), 1.25 (br s, 30H, C(3-17)- $\text{CH}_2$ ), 1.54-1.57(m, 2H, C2-  $\text{CH}_2$ ), 2.15 (t, 1H,  $J=6.2$  Hz, *sn*-3 OH), 3.44 (t,  $J=6.1$  Hz, C1- $\text{CH}_2$ ), 3.56-3.69 (m, 5H, *sn*-1  $\text{CH}_2$ , *sn*-2 CH, *sn*-3  $\text{CH}_2$ ), 4.61-4.74 (dd, 2H,  $J=11.8$ , 16.3 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 7.30-7.36 (m, 7H, Ar);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.3 (C18), 22.8 (C17), 26.3 (C3), 29.5 (C15), 29.7 (C4), 29.8-29.9 (C5-C14,C16), 32.1 (C2), 63.2 (C1), 71.3 and 72.2 (C *sn*-1, *sn*-3 and  $\text{CH}_2$  Ar), 78.0 (C *sn*-2), 127.9, 128.6 and 138.47 (Ar). MS calculated for :  $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{NaO}_3^+$  457.4. Found  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : 457.4

### 1-Benzyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-phosphocholine (6)

To a solution of 1-benzyl-2-octadecyl-*rac*-glycidol **4** (0.4 g, 0.92 mmol) in toluene (12 mL) at  $0^\circ\text{C}$ , a solution of triethylamine (1.54 g, 13.8 mmol) and chlorophospholane (1.4 g, 13.8 mmol) were added. The mixture was stirred 18 h at room temperature and concentrated to obtain an amorphous brown compound (**5**). In a stainless steel Paar reactor, to the crude mixture dissolved in acetonitrile (30 mL) was added rapidly a solution of cold trimethylamine (0.9 mL, 9.2 mmol). The reaction was stirred at  $70^\circ\text{C}$  for 18 hours. After removal of the excess of trimethylamine, the mixture was purified by column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:35:4) and gave a white paste, 1-benzyl-2-octadecyl-*rac*-glycerol-3-phosphocholine **6** (0.38 g, 69%).

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.89 (t, 3H,  $J=7.0$  Hz, C18- $\text{CH}_3$ ), 1.24 (s, 30H, C (3-17)- $\text{CH}_2$ ), 1.50-1.53 (m, 2H, C2- $\text{CH}_2$ ), 3.53 (s, 9H N-( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 3.57-3.68 (m, 6H,C1- $\text{CH}_2$ , N- $\text{CH}_2$ , *sn*-3  $\text{CH}_2$ ), 3.97 (s, 3H, *sn*-1  $\text{CH}_2$ , *sn*-2 CH), 4.31 (s, 2H, PO- $\text{CH}_2$ ), 4.51 (dd, 2H,  $J=12.0$ , 14.2 Hz  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 7.31-7.32 (m, 5H, Ar);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.23 (C18), 22.8 (C17), 26.3 (C3), 29.5 (C15), 29.8 (C4), 29.8-30.3 (C5-C14, C16), 32.1 (C2), 54.4 (( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 60.1 (C-N), 65.65 ( $J_{\text{P-C}} = 5.89$  Hz, C *sn*-3), 69.62 ( $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 70.7 (PO- $\text{OCH}_2$ ), 73.5 (C *sn*-1), 77.7 (C *sn*-2), 127.8, 127.9, 128.6, 138.5 (C Ar);  $^{31}\text{P}$  NMR (120 MHz)  $\delta$  -2.32; MS (ESI positive mode) calculated for  $\text{C}_{33}\text{H}_{63}\text{NO}_6\text{P}^+$  : 600.4 Found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 600.5

### 2-Octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (7)

A solution of **6** (0.530 g, 0.88 mmol) in MeOH (20 mL) with Pd/C (10%) (0.080 g) was stirred under  $\text{H}_2$  at room temperature for 18h. The solution was then filtered and the solvent was evaporated to give 2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine **7** (459 mg, 99%) as a white waxy paste.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.89 (t, 3H,  $J= 6.6$  Hz, C18- $\text{CH}_3$ ), 1.28-1.33 (m, 30H, C (3-17)- $\text{CH}_2$ ), 1.52-1.56 (m, 2H, C2- $\text{CH}_2$ ), 3.23 (s, 9H N-( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 3.50-3.37 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ , CH *sn*-1, C1), 3.70-3.74 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  *sn*-3), 3.97-4.22 (m, 2H, PO- $\text{CH}_2$ , CH *sn*-1), 4.43 ( m, 1H, *sn*-2 CH),  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.5 (C18), 23.8 (C17), 27.2 (C3), 30.5 (C15), 30.7 (C4), 30.78, 30.81, 31.2 (C5-C14, C16), 33.1 (C2), 54.60, 54.63, 54.67 (( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 60.1 (C-N,  $J_{\text{C-P}} = 4.40$  Hz), 61.7 (C *sn*-1), 66.0 (PO-C,  $J_{\text{P-C}} = 5.87$  Hz), 67.0 (C1), 69.0 (C *sn*-3 ,  $J_{\text{P-C}}=5.13$ ), 80.4 (C *sn*-2,  $J_{\text{P-C}} = 8.07$  Hz);  $^{31}\text{P}$  NMR (120 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.24; MS (ESI positive mode) calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{57}\text{NO}_6\text{P}^+$  : 510.4. Found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 510.5

### 1- $\alpha$ -Eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (8)

2-Octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine **7** (0.1 g, 0.15 mmol) and  $\alpha$ -eleostearic acid (0.14 g, 0.5 mmol) were dissolved in alcohol free and anhydrous  $\text{CHCl}_3$  (5mL). Freshly re-



crystallized (pentane) Ppyr (0.074 g, 0.5 mmol) was dissolved with DCC (0.1 g, 0.5 mmol) in alcohol free and anhydrous  $\text{CHCl}_3$  (3 mL) and stirred for 3 min. The mixture was then added dropwise to the previous reaction and stirred at room temperature for 20 hours. The heterogeneous reaction was filtered to eliminate the DCU and purified by silica gel flash chromatography (eluent  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O, 75:25:3 v/v/v). Fractions containing the product were further purified by ion exchange chromatography using Amberlyst<sup>®</sup> 15 resin (eluent  $\text{CHCl}_3$ /MeOH/H<sub>2</sub>O, 75:25:3 v/v/v) affording 1- $\alpha$ -eleostearoyl-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (EOPC, **8**, 77 mg) with 48% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.85-0.91 (m, 6H, C18-CH<sub>3</sub>, C36-CH<sub>3</sub>), 1.25-1.39 (m, 40H C(4-7, 16, 17, 21-35)-CH<sub>2</sub>), 1.52-1.5 (m, 4H C(3,20)-CH<sub>2</sub>), 2.06-2.17 (m, 4H, C(8,15)-CH<sub>2</sub>), 2.31 (m, 2H, C2-CH<sub>2</sub>), 3.41, (s, 9H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.66-3.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 4.03-4.13 (m, 4H, C(C19, *sn*-3)-CH<sub>2</sub>), 4.25 (m, 2H, *sn*-1-CH<sub>2</sub>), 4.52 (m, 2H, PO-CH<sub>2</sub>), 5.36-5.39 (m, 1H, *sn*-1-CH), 5.65-5.72 (m, 2H, C(9,14)-CH), 5.94-6.20 (m, 3H, C(10, 11, 13)-CH), 6.20-6.36 (m, 1H C12-CH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.0 (C1), 14.1 (C19), 22.2 (C17), 22.7 (C35), 25.1 (C3), 26.0 (C26), 27.9 (C15), 29.5, 29.55, 29.86, 29.6, 29.96, 30.04, 31.6, 32.1, 32.7 (C4-C14, C16, C22-C25), 34.2 (C3), 54.5 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.0 (C-N), 63.1 (PO-C,  $J_{\text{C-P}}$  = 3.67 Hz), 64.4 (C *sn*-3,  $J_{\text{C-P}}$  = 5.14 Hz), 66.4 (C1), 69.3 (C *sn*-1), 71.8 (C *sn*-2,  $J_{\text{C-P}}$  = 8.07 Hz), 126.0 (C30), 128.9 (C28), 130.7 (C31), 131.8 (C27), 133.0 (C29), 135.3 (C32), 173.9 (C19); <sup>32</sup>P-NMR (120 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ -0.92; HR-MS (ESI, positive mode) calculated for C<sub>44</sub>H<sub>85</sub>NO<sub>7</sub>P<sup>+</sup> : 770.6064. Found [M+H]<sup>+</sup> : 770.6022

## Synthesis of 1-octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (OEPC)

### 1-Octadecyl-3-trityl-*rac*-glycerol (**9**)

Octadecanol (34 mmol, 8.12 g) in DMF (50 mL) was stirred for 30 min at 45°C until complete dissolution and cooled at room temperature. NaH (34 mmol, 1.2 g) in DMF (6 mL) was added to the previous mixture. Then, a solution of trityl-glycidol **1** (4 g, 12.6 mmol) in DMF (10 mL) was added dropwise in the reaction and stirred 2h30 at 100°C. After cooling, the reaction was diluted with H<sub>2</sub>O (40 mL) and extracted with diethyl ether (4x60 mL). The combined organic extract was dried with MgSO<sub>4</sub> and then concentrated. Excess of DMF was distilled off (bath temperature 100°C, 130 Pa) and the residue was purified by silica gel column chromatography (pentane/diethyl ether 66:33 v/v) giving 1-octadecyl-3-triyl-*rac*-glycerol **9** (3.8 g, 52%)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.89 (t, 3H,  $J$  = 6.6 Hz, C18-CH<sub>3</sub>) 1.25-1.29 (30H, C (3-17)-CH<sub>2</sub>), 1.51-1.54 (m, 2H, C2-CH<sub>2</sub>) 3.16-3.20, (m, 2H, C1-CH<sub>2</sub>), 3.40-3.52, (m, 4H, CH<sub>2</sub> *sn*-1, CH<sub>2</sub> *sn*-3), 3.93-3.95 (m, 1H, CH *sn*-2), 7.20-7.40 (m, 15H, Ar<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.3 (C18), 22.8 (C17), 26.3 (C3), 29.5 (C15), 29.7 (C4), 29.8-29.9 (C5-C14), 32.1 (C2) 64.7 (C1), 70.0 (C *sn*-2), 70.6 and 70.9 (C *sn*-1 and *sn*-3), 86.8 (C-Ar<sub>3</sub>), 122.2, 127.4, 127.8, 128.0-128.1, 128.8, 144.0 (C Ar); MS (ESI positive mode) calculated for C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>NaO<sub>3</sub><sup>+</sup> : 609.4. Found [M+Na]<sup>+</sup> : 609.4

### 1-Octadecyl-2-benzyl-3-trityl-*rac*-glycerol (10)

To 1-octadecyl-3-trityl-*rac*-glycerol **9** (2 g, 3.4 mmol), NaH (5.1 mmol, 0.122 g) was added and stirred 15 min in DMF (20 mL). After addition of benzyl bromide (5.1 mmol, 0.6 mL), the reaction was stirred for 48 h at room temperature. The mixture was diluted with water (30 mL) and the aqueous phase extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x30 mL). The combined organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub>, concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by silica gel column chromatography (pentane/ DCM 66:33 v/v) providing 1-octadecyl-2-benzyl-3-trityl-*rac*-glycerol **10** (1.7 g, 74%) as a white paste.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 0.94 (t, 3H, *J*= 6.7 Hz, C18-CH<sub>3</sub>) 1.32 (s, 30H, C (3-17)-CH<sub>2</sub>), 1.56-1.60 (m, 2H, C2-CH<sub>2</sub>), 3.30 (d, 2H, *J*= 4.9, CH<sub>2</sub> *sn*-1), 3.45 (t, 2H, *J*= 6.6 Hz, C1-CH<sub>2</sub>), 3.62-3.64 (m, 2H CH<sub>2</sub> *sn*-3), 3.78-3.80 (m, H, CH *sn*-2), 4.71 (d, 2H, *J*= 2.2 Hz, CH<sub>2</sub> Ar), 7.25-7.42 (15H, CH Ar<sub>3</sub>), 7.50-7.53 (5H, Ar); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 14.3 (C18), 22.8 (C17), 26.3 (C3), 29.5 (C15), 29.7 (C4), 29.8-29.9 (C5-C14), 32.1 (C2) 63.8 (C1), 71.44, 71.76 (C *sn*-3 and C *sn*-1), 72.3 (C CH<sub>2</sub> Ar), 77.7 (C *sn*-2), 127.0, 127.6, 127.85, 127.9, 128.4, 128.5, 128.9, 139.0, 144.2 (C Ar); MS (ESI positive mode) calculated for C<sub>47</sub>H<sub>64</sub>NaO<sub>3</sub><sup>+</sup> : 699.5. Found [M+Na]<sup>+</sup> : 699.6

### 1-Octadecyl-2-benzyl-*rac*-glycerol (11)

To a solution of 1-octadecyl-2-benzyl-3-trityl-*rac*-glycerol **10** (0.8 g, 1.2 mmol) in MeOH (40 mL), camphorsulfonic acid (55 mg, 0.24 mmol) was added. The heterogeneous reaction mixture was stirred for 18 hours at room temperature and poured into a mixture of sat. aq solution of NH<sub>4</sub>Cl (50 mL) and water (20 mL). The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). The combined organic solution was dried with MgSO<sub>4</sub> and then concentrated. The residue was purified by column chromatography (Pentane/Ethyl Acetate 85:15 v/v) to give 1-octadecyl-2-benzyl-*rac*-glycidol **11** (0.47 g, 90%)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 (t, 3H, *J*= 6.7 Hz, C18-CH<sub>3</sub>), 1.32 (s, 30H, C (3-17)-CH<sub>2</sub>), 1.54-1.59 (m, 2H, C2-CH<sub>2</sub>), 2.13-2.17 (m, 1H C *sn*-3 OH), 3.54 (2H, td, *J*= 1.5, 6.7 Hz C1-CH<sub>2</sub>), 3.61-3.65 (dq, 2H, *J*= 9.9, 13.8, 9.9, 14.3 Hz, CH<sub>2</sub> *sn*-1), 3.73-3.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub> *sn*-3), 3.82-3.87 (m, 1H, CH *sn*-2), 4.65 (dd, *J*= 11.7, 23.6 Hz, 2H CH<sub>2</sub> Ar), 7.29-7.36 (m, 5H, Ar); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 14.3 (C18), 22.8 (C17), 26.3 (C3), 29.5 (C15), 29.6 (C4), 29.7-29.8 (C5-C14), 32.0 (C2) 63.2 (C1), 71.3, 72.0 (C *sn*-1 and C *sn*-3), 72.2 (C CH<sub>2</sub> Ar), 77.9 (C *sn*-2) 127.9, 128.6, 138.5 (C Ar); MS calculated for : C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>NaO<sub>3</sub><sup>+</sup> 457.4. Found [M+Na]<sup>+</sup> : 457.4

### 1-Octadecyl-2-benzyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (12)

To a solution of 1-octadecyl-2-benzyl-*rac*-glycidol **11** (0.8 g, 1.8 mmol) in toluene (12 mL) a solution of triethylamine (0.46 g, 4.6 mmol) and chlorophospholane (0.65 g, 4.6 mmol) were added at 0°C. The mixture was stirred for 18 h at room temperature and concentrated to obtain an amorphous brown compound (**10**). In a stainless steel Paar reactor, to the crude mixture dissolved in acetonitrile (30 mL) was added rapidly a solution of cold trimethylamine (1.68 mL, 18 mmol). The reaction was stirred at 70°C for 18h. The excess of trimethylamine was removed, the mixture was purified by column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O

65:35:4 v/v/v) and gave a white paste 1-octadecyl-2-benzyl-*rac*-glycerol-3-phosphocholine **12** (0.88 g, 98%).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.87 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz, C18- $\text{CH}_3$ ), 1.23 (s, 30H, C (3-17)- $\text{CH}_2$ ), 1.51 (t, 2H,  $J=6.1$  Hz, C2- $\text{CH}_2$ ), 3.08 (s, 9H, N-( $\text{CH}_3$ ) $_3$ ), 3.37 (t, 2H,  $J=6.6$  Hz, C1- $\text{CH}_2$ ), 3.49-3.52 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ , CH *sn*-1), 3.73 (s, H, *sn*-1 CH), 3.89-3.91 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  *sn*-3), 4.12-4.15 (m, 3H, PO- $\text{CH}_2$ , CH *sn*-2), 7.21-7.36 (m, 5H, C-Ar);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.3 (C18), 22.8 (C17), 26.3 (C3), 29.5 (C15), 29.79 (C4), 29.81-30.1 (C5-C14, C16), 32.1 (C2), 54.3 (( $\text{CH}_3$ ) $_3$ ), 60.0 ( $J_{\text{C-P}} = 4.4$  Hz, C  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 65.6 ( $J_{\text{C-P}} = 5.9$  Hz, PO- $\text{CH}_2$ ), 65.9 ( $J_{\text{C-P}} = 6.6$  Hz, C *sn*-3), 69.6 (C1), 70.7 (C *sn*-1), 73.5 ( $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 77.7 (C *sn*-2), 127.8, 128.5 (C Ar);  $^{31}\text{P}$  NMR (120 MHz)  $\delta$  -0.93; MS (ESI positive mode) calculated for  $\text{C}_{33}\text{H}_{63}\text{NO}_6\text{P}^+$  : 600.4. Found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 600.5

### 1-Octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (13)

A solution of **12** (230 mg, 0.38 mmol) in MeOH (10 mL) with Pd/C (10%) (35 mg) was stirring for 18h at room temperature under  $\text{H}_2$  atmosphere. The solution was then filtered on Celite and concentrated. 1-Octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine **13** (459 mg, 99%) was obtained as a white waxy paste.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz MeOD)  $\delta$  0.90 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz, C18- $\text{CH}_3$ ), 1.29 (s, 30H, C (3-17)- $\text{CH}_2$ ), 1.51 (t, 2H,  $J=6.8$  Hz C2- $\text{CH}_2$ ), 3.23 (s, 9H, N-( $\text{CH}_3$ ) $_3$ ), 3.46-3.48 (m, 4H C1,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 3.65-3.67 (m, 2H, C *sn*-1), 3.88-3.95 (C *sn*-1 and *sn*-2), 4.30-4.31 (m, 2H, PO- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.5 (C18), 23.7 (C17), 27.2 (C3), 30.4 (C15), 30.66 (C4), 30.7 (C5-C14, C16), 33.1 (C2), 54.7 (( $\text{CH}_3$ ) $_3$ ), 60.4 ( $J_{\text{C-P}} = 5.14$  Hz, C  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 65.9 ( $J_{\text{C-P}} = 2.2$  Hz, PO- $\text{CH}_2$ ), 67.4 (C1), 68.5 ( $J_{\text{C-P}} = 5.9$  Hz, C *sn*-1), 70.9 (C *sn*-2), 72.7 (C *sn*-2);  $^{31}\text{P}$  NMR (120 MHz)  $\delta$  -0.8; MS (ESI positive mode) calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{57}\text{NO}_6\text{P}^+$  : 510. Found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 510.5

### 1-Octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (14)

1-Octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine **13** (100 mg, 0.075 mmol) and  $\alpha$ -eleostearic acid (140 mg, 0.5 mmol) was dissolved in alcohol free and anhydrous  $\text{CHCl}_3$  (5 mL). Freshly recrystallized (pentane) Ppyr (74 mg, 0.5 mmol) was dissolved with DCC (100 mg, 0.5 mmol) in alcohol free and anhydrous  $\text{CHCl}_3$  (3 mL) and stirred for 3 min. The mixture was then added dropwise to the previous reaction and stirred at room temperature for 20 hours. The heterogeneous reaction was purified by flash chromatography on silica gel (50 g, eluent  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 75:25:3 v/v/v). Fractions containing the product were further purified by ion exchange chromatography using Amberlyste<sup>®</sup> 15 resin (eluent  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 75:25:3 v/v/v). 1-Octadecyl-2- $\alpha$ -eleostearoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (EOPC, **14**, 20 mg) was obtained with 17% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.87-0.91 (m, 6H, C(18, 36)- $\text{CH}_3$ ), 1.25-1.37 (m, 40H C (22-25, 34, 35, 3-17)- $\text{CH}_2$ ), 1.52-1.5 (m, 4H C(2, 21)- $\text{CH}_2$ ), 2.06-2.17 (m, 4H, C(26,33)- $\text{CH}_2$ ), 2.31 (m, 2H, C20- $\text{CH}_2$ ), 3.38, (s, 9H, N-( $\text{CH}_3$ ) $_3$ ), 3.40-3.49 (m, 2H, C1), 3.93-4.06 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ,  $\text{CH}_2$  *sn*-1, CH *sn*-3), 4.23-4.25 (m, H, CH *sn*-3), 4.43 (s, 2H, PO- $\text{CH}_2$ ), 5.12-5.15 (1H, CH *sn*-2), 5.34-5.39 (m, H, C9-CH), 5.65-5.71 (m, H, C14-CH), 5.95-6.18 (m, 3H, (C10, C11, C13)-CH), 6.33-6.39 (m, H, C12-CH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.1 (C1), 14.3

(C19), 22.4 (C17), 22.8 (C35), 25.1 (C3), 26.2 (C26), 28.0 (C15), 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.72, 29.78, 29.82, 29.87, 29.90, (C4-C14, C16, C22-C25), 31.6, (C3), 32.6 (C3), 54.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.3, (C-N), 60.4 (PO-C,  $J_{C-P}$  = 5.4 Hz), 66.2 (C *sn*-3,  $J_{C-P}$  = 8.07), 69.1 (C1), 71.9 (C *sn*-1), 77.4 (C *sn*-2), 126.1 (C30), 128.9 (C28), 130.7 (C31), 132.0 (C27), 133.0 (C29), 135.4 (C32), 173.5 (C19); <sup>31</sup>P NMR (120 MHz)  $\delta$  -2.25; HR-MS (ESI, positive mode) calculated for C<sub>44</sub>H<sub>85</sub>NO<sub>7</sub>P<sup>+</sup>: 770.6064, Found H<sup>+</sup> 770.6029

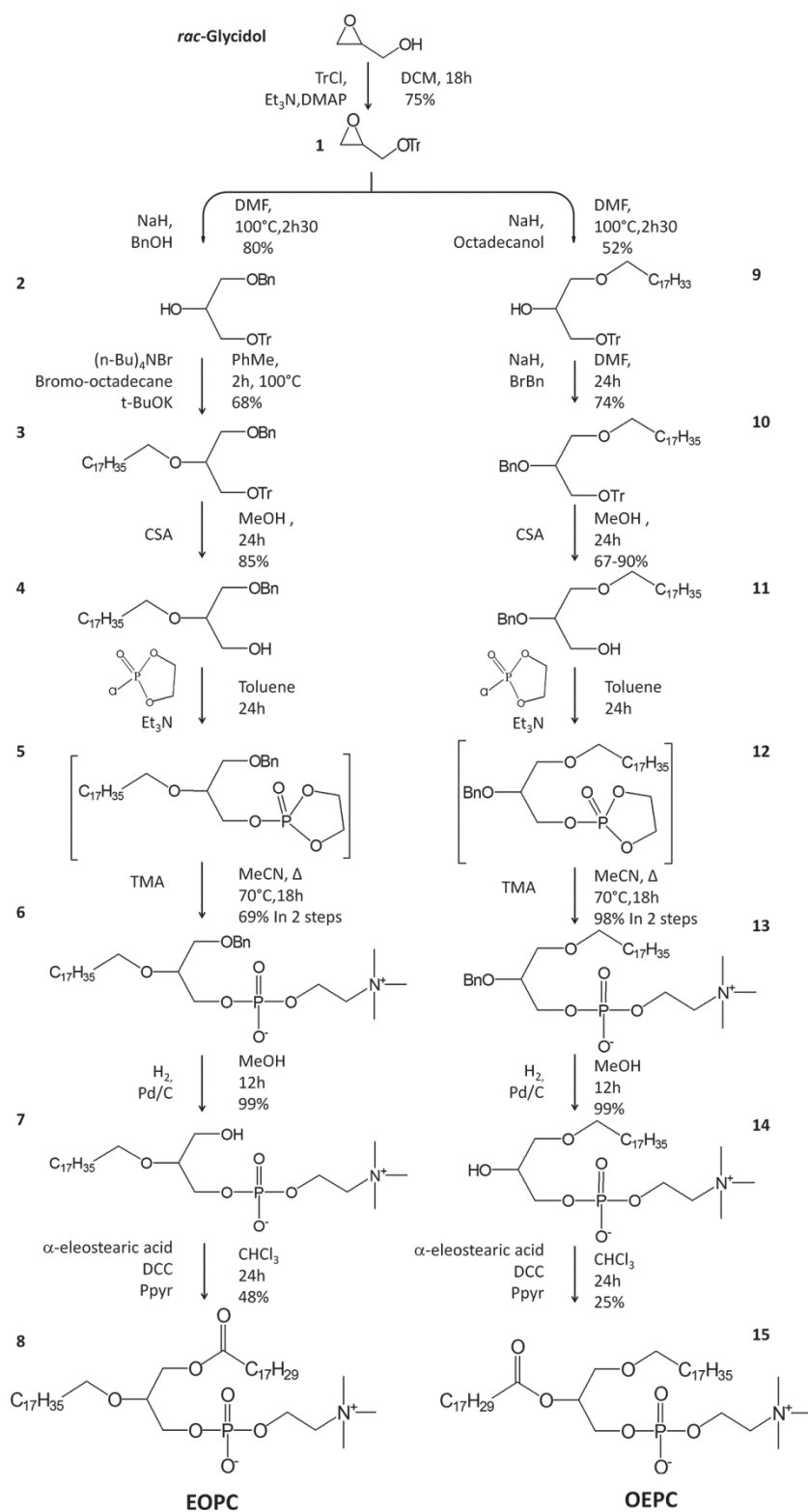


Figure S-1 : Synthesis of EOPC and OEPC in eight steps from racemic glycidol.

## REFERENCES

(1) Hocek, M.; Masojídková, M.; Holý, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1996**, *61*, 1525-1537.

(2) White, J. D.; Lincoln, C. M.; Yang, J.; Martin, W. H.; Chan, D. B. *J.Org.Chem.* **2008**, 73, 4139-4150.



## **Expression, purification et réévaluation du rôle de la protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique.**

### **RÉSUMÉ**

L'hydrolyse des triglycérides (TG) du tissu adipeux est initialisée par l'action de l'adipocyte TG lipase (ATGL), activée par son cofacteur la protéine CGI-58. Des mutations du gène codant les protéines CGI-58 ou ATGL sont respectivement à l'origine du syndrome de Chanarin-Dorfmann et de maladies de stockage de lipides neutres. La protéine CGI-58 appartient à la famille des  $\alpha/\beta$ -hydrolases, elle en possède la triade catalytique Ser-Asp/Glu-His caractéristique des carboxylester hydrolases, ainsi que le motif HX<sub>4</sub>D, caractéristique d'une activité acyltransférase. A ce jour, le rôle de la protéine CGI-58, chez les mammifères ou chez les plantes, n'est pas totalement éclairci, de même que son activité enzymatique. Dans le but de mieux comprendre le rôle de cette protéine CGI-58 dans le métabolisme lipidique, nous avons développé une nouvelle stratégie, en générant notamment de nouveaux plasmides qui nous ont permis d'exprimer et de purifier la protéine CGI-58 de souris et de plantes, ainsi que l'ATGL murine, dans différents souches d'*E. coli*, pour tester l'activité *in vitro* de ces protéines. De plus, nous avons mis en place, en utilisant ces plasmides générés et différentes souches *E. coli*, un système qui nous a permis de tester *in vivo*, dans *E. coli*, l'activité acyltransférase (LPAAT et/ou LPGAT) de la protéine CGI-58. En utilisant ces différentes techniques, nous avons pu montrer, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, que la protéine CGI-58 de plante, ainsi que celle de mammifère, ne possède ni activité LPAAT ni activité LPGAT, et que la protéine CGI-58 de plante est dépourvue d'activité TG lipase ou phospholipase. Cependant, nous avons montré, en analysant, par chromatographie sur couche mince et par spectrométrie de masse, des extraits lipidiques des différentes souches d'*E. coli* exprimant la protéine CGI-58, que l'expression de la protéine de plante, et non celle de mammifère, aboutit à une diminution du taux de phosphatidylglycérol (PG) dans les différentes souches testées, et *a contrario* nous avons montré que la mutation de la sérine, ainsi que la mutation de l'histidine de la triade catalytique potentielle, restaure le phénotype sauvage. Ces résultats nous ont permis de proposer que la protéine CGI-58 de plante est impliquée dans le métabolisme du PG.

## **Expression, purification and re-evaluation of the role of CGI-58 protein in lipids metabolism.**

### **ABSTRACT**

Triglycerides (TG) hydrolysis in adipose tissue is initialized by the action of the adipose TG lipase (ATGL) and its cofactor, the CGI-58 protein. Mutations in the gene coding the CGI-58 or ATGL proteins are the cause of the syndrome of Chanarin-Dorfman and of neutral lipids storage disease, respectively. CGI-58 protein belongs to the  $\alpha/\beta$ -hydrolase family, harboring the catalytic triad Ser-Asp/Glu-His, characteristic of carboxylester hydrolases, as well as the HX<sub>4</sub>D motif, characteristic of acyltransferase activity. Nowadays, the role and the enzymatic activity of the CGI-58 protein, in mammals and plants, are not quite clear. In order to better understand the function of CGI-58 protein in lipid metabolism, we developed a new strategy using a new set of plasmids that enabled us, with the use of pET28b(+) plasmid, to express and purify the CGI-58 protein of mice and plants as well as the murine ATGL. These proteins were expressed in different *E. coli* strains, to test *in vitro* their activity. In addition, we have set up, using the generated plasmids and different *E. coli* strains, a system that allowed us to test the *in vivo* acyltransferase activity (LPAAT and/or LPGAT) of the CGI-58 proteins expressed in *E. coli*. Using these techniques, we demonstrated *in vivo* and *in vitro* that both mice and plant CGI-58 proteins, are neither able to catalyze a LPAAT or a LPGAT reaction, and that the plant CGI-58 protein is devoid of TG lipase or phospholipase activity. However we have shown, by analyzing lipid extracts, by thin layer chromatography and by mass spectrometry of different *E. coli* strains expressing the CGI-58 protein, that the expression of the plant CGI-58 protein, but not the mice one, results in a decrease of phosphatidylglycerol (PG) content in the different strains tested. However the mutation of the serine or histidine residue of the putative catalytic triad restores the wild-type phenotype. These results allowed us to propose that plant CGI-58 protein is involved in the metabolism of PG.